

KERNPROTEINE BEI Chironomus (Diptera).

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN DEN
POLYTÄNEN SPEICHELDRÜSENKERNEN VON
C. pallidivittatus, C. thummi thummi, C. thummi piger
UND Glyptotendipes barbipes**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Josef Bendermacher-Geroussis
aus Athen

1982

Oktober 1981

KERNPROTEINE BEI Chironomus (Diptera).

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN DEN
POLYTÄNEN SPEICHELDRÜSENKERNEN VON
C. pallidivittatus, C. thummi thummi, C. thummi piger
UND Glyptotendipes barbipes**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Josef Bendermacher-Geroussis
aus Athen

Oktober 1981



1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Horst Kress
2. Berichterstatter: Professor Dr. Karl B. Moritz

Tag der mündlichen Prüfung: 22.6.1982

Herrn Professor Dr. U. Grossbach bin ich besonders dankbar für sein stetes, förderndes Interesse, die Überlassung aller Arbeitsmöglichkeiten und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Privatdozent Dr. H. Kress bedanke ich mich für seine freundlichen Bemühungen um diese Arbeit.

Herrn Dr. E.R. Schmidt danke ich herzlich für seinen großen Beitrag während der Zusammenarbeit, vor allem für die Durchführung der DNA-Protein Bindungsexperimente. Ihm und Herrn Professor Dr. H.-G. Keyl gilt mein Dank auch für die freundliche Überlassung von Versuchstieren und die Bereitschaft zur Diskussion.

Für die Unterstützung vor allem in der Anfangsphase der Arbeit möchte ich Herrn Dr. P. Holmgren herzlich danken.

Herrn Dr. H.D. Probeck danke ich herzlich für die freundschaftliche Diskussion und Hilfe bei der Anfertigung des deutschen Textes. Frau I. Streichhan und Frau B. Probeck sorgten dankenswerterweise für die ordentliche Fertigstellung der Zeichnungen und des Manuskriptes.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Versuchstiere	3
2.1.1. Freiland-Tiere	3
2.1.2. Labortiere	3
2.1.3. Artbestimmung der Freilandpopulationen	4
2.2. Präparationsmethoden	4
2.2.1. Isolierung und Reinigung der larvalen Speicheldrüsen	4
2.2.2. Isolierung der Speicheldrüsenkerne und Präparation der Kernproteine	5
2.3. Elektrophorese	5
2.4. Galaktose-Behandlung von <u>Chironomus pallidivittatus</u>	6
2.5. Hitzeschock bei <u>Chironomus pallidivittatus</u>	7
2.6. Kältebehandlung von <u>Chironomiden</u> -Larven	7
3. Ergebnisse	8
3.1. Isolierung und Reinigung der Zellkerne	8
3.1.1. Isolierung der Speicheldrüsen	8
3.1.2. Kernisolierung und Ausbeute an Kernproteinen	11
3.2. Die Kernproteine der larvalen Speicheldrüsen bei <u>Chironomiden</u> -Arten mit unterschiedlichem Gehalt an Heterochromatin	18
3.2.1. Vergleichende elektrophoretische Analyse der Proteine aus den Speicheldrüsenkernen von <u>Chironomus</u> -Arten	19
3.2.1.1. <u>Chironomus thummi thummi</u> und <u>Chironomus thummi piger</u>	19
3.2.1.2. <u>Chironomus pallidivittatus</u>	29

3.2.2.	Elektrophoretische Analyse der Kernproteine von <u>Glyptotendipes barbipes</u> (<u>Chironomidae</u>)	36
3.2.3.	Präferentielle Bindung von <u>Chironomus</u> Kernproteinen an eine DNA-Fraktion aus <u>Chironomus thummi thummi</u>	41
3.3.	Die Kernproteine der larvalen Speicheldrüsen von <u>Chironomus pallidivittatus</u> nach experimenteller Aktivitätsveränderung spezifischer Genorte	45
4.	Diskussion	67
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literaturverzeichnis	79

Abkürzungen:

A-T-reiche DNA	Adenin-Thymidin-reiche DNA
B.R.	Balbiani-Ring
D	Dalton
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SDS	Sodium dodecyl sulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	hydroxymethyl.aminomethan



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

Für das Verständnis der molekularen Architektur der Chromosomen sowie der differentiellen Gen-Expression in Eukaryonten-Kernen und ihrer Regulation ist die Identifizierung und Charakterisierung von spezifischen Kernproteinen wahrscheinlich von zentraler Bedeutung (vgl. z.B. Chambon, 1978).

Wegen ihrer Riesenchromosomen haben die Speicheldrüsenkerne von Drosophila für die Lokalisierung bestimmter Proteine im Kern mit Hilfe von indirekter Immunofluoreszenz (Rodriguez Alfageme et al., 1976, 1980; Silver and Elgin, 1977, Elgin et al., 1978) und mit Hilfe von DNA-Protein-Bindungsstudien (Blumenfeld et al., 1978, Hsieh und Brutlag, 1979) besonderes Interesse gefunden. Der besondere Vorteil der Riesenchromosomen von Chironomus besteht neben ihrer Größe in der Ausbildung von zellspezifischen Balbiani-Ringen, Chromosomenorten mit besonders hoher genetischer Aktivität (Beermann, 1952; Pelling, 1964; Daneholt, 1975; Lamb und Daneholt, 1979). Da in einigen von ihnen die Genorte zellspezifischer Syntheseprodukte lokalisiert worden sind (Beermann, 1961; Grossbach, 1969) stellt die Speicheldrüse möglicherweise ein geeignetes System zur Untersuchung der Genregulation dar.

Die Kernproteine der Speicheldrüsen von Chironomus-Arten sind bisher von einer Reihe von Autoren elektrophoretisch untersucht worden (Müller, 1979; Mähr et al., 1977; Plagens, 1978). Ein Vergleich der Proteine aus den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans mit Elektrophorogrammen der Proteine aus Kernmembran bzw. Nucleolen ergab nur wenige quantitative Unterschiede (Tanguay und Nicole, 1980; Nicole und Tanguay, 1980). Unter Hitzeschockbehandlung (Ritossa, 1962, 1964) traten in den Speicheldrüsenkernen von Chironomus tentans neue Kernproteine von 68.000 D und 34.000 D auf (Vincent und Tanguay, 1980, Tanguay und Vincent, 1981).

Fortschritte für das Verständnis der Rolle bestimmter Kernproteine sind zu erwarten durch Verbesserung der elektrophoretischen Auftrennung mit dem Ziel der Identifizierung gewebe- oder stadienspezifischer Proteinfaktionen, sowie durch die Entwicklung von Methoden zur präparativen Gewinnung des Untersuchungsmaterials, um solche Proteine charakterisieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine neue Methode zur Massenisolierung von polytären Speicheldrüsenkernen von Chironomiden-Larven beschrieben. Aus den Kernen wurden dann die gesamten Proteine isoliert und elektrophoretisch auf Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. Im Mittelpunkt des Interesses standen zwei Fragen. Erstens wurden die Kerne von Chironomidenarten mit unterschiedlichem Heterochromatin-Gehalt vergleichend untersucht, um in der Vielfalt der Kernproteine unter Umständen Heterochromatin-spezifische Fraktionen zu identifizieren. Die Elektropherogramme wurden, in Zusammenarbeit mit E. Schmidt (Bochum), auf Bindung der Proteinfaktionen an AT-reiche Heterochromatin-DNA (Schmidt, 1981) untersucht.

Zweitens wurden Korrelationen zwischen dem Muster der Kernproteine und experimentellen Veränderungen der genetischen Aktivität der Speicheldrüsenzellen geprüft, die in der Größenveränderung von Balbiani-Ringen zum Ausdruck kommen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurde jeweils das IV. Larvenstadium verschiedener Chironomiden-Arten verwendet. Die Tiere stammten sowohl aus Freilandfängen als auch aus Laborzuchten.

2.1.1. Freiland-Tiere

Es wurden zwei Freilandpopulationen der Unterart Chironomus thummi thummi (KIEFFER) bearbeitet. Dabei handelte es sich um eine "norddeutsche" Population aus Kiesteichen der Göttinger Umgebung (Nörten-Hardenberg) und um eine "süddeutsche" Population aus Teichen der Münchner Umgebung. In beiden Fällen stammten die Tiere also aus definierten Sammlungsarealen.

Als dritte Freilandpopulation stammte Glyptotendipes barbipes (STAEGER) vor allem aus einem Teich auf dem Campus der Ruhr-Universität Bochum,* daneben auch von einem Fundort in Göttingen.

2.1.2. Labortiere

Ingezüchtete Larven der beiden Unterarten Chironomus thummi thummi (KIEFFER) und Chironomus thummi piger (STRENZKE) stammten ebenfalls aus Bochum.

Als weitere Chironomiden-Art ist Chironomus pallidivittatus (MALLOCH) aus unserem Labor verwendet worden. Dieses Tiermaterial ist seit mehreren Jahren ingezüchtet und

* Herrn Professor Dr. H.-G. Keyl bin ich besonders dankbar für die Überlassung dieses Tiermaterials.

ab Sommer 1977 zur Massenzucht vorbereitet worden. Die Aufzucht erfolgte nach Angaben von Beermann (1952) in Plastikschalen (Bodenfläche 60 x 40 cm², Deckelhöhe 10 cm). Bei 18°C betrug die Generationsdauer etwa vier Wochen. Ab April 1978 konnten monatlich etwa 5.000 Tiere des vierten Larvenstadiums abgesammelt werden.

2.1.3. Artbestimmung der Freiland-Populationen

Mittels cytologischer Quetschpräparate larvaler Speicheldrüsen wurde die Taxonomie des gelieferten Freilandmaterials überprüft (Bauer, 1945; Beermann, 1952; Keyl, 1959). Mit Hilfe der Chromosomen-Karten von Keyl (1957) konnte die Unterart Chironomus thummi thummi zweifelsfrei sichergestellt werden.

Unter den Chironomus thummi-Tieren konnte vereinzelt die Unterart Chironomus thummi piger vermutet werden, was die cytologische Überprüfung bestätigte. Allerdings war die Anzahl der Chironomus thummi piger weit unterrepräsentiert, so daß ihre Anwesenheit die untersuchten Fragestellungen nicht beeinträchtigte.

2.2. Präparationsmethoden

2.2.1. Isolierung und Reinigung der larvalen Speicheldrüsen

Larven des vierten Larvenstadiums wurden in Kulturmedium (0.06% NaCl) gewaschen. Auf einer eisgekühlten Glasplatte wurden die Vorderkörper der Larven hinter dem dritten Thorax-Segment abgeschnitten. Die gesammelten Thorax-Segmente wurden fünfmal mit eisgekühlter Chironomus-Ringerlösung (Robert, 1975; 87 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.3) gewaschen. Durch Zentrifugation der Thoraxsegmente in einem diskontinuier-

lichen Saccharose-Gradienten wurden die Drüsen isoliert. Nach einem Reinigungsschritt in der Ringer-Lösung wurden die Drüsen vom Sekret befreit. Die Einzelheiten werden im Kapitel 3.1. beschrieben.

2.2.2. Isolierung der Speicheldrüsenkerne und Präparation der Kernproteine

Die gereinigten und von Sekret befreiten Speicheldrüsen wurden in der Chironomus-Ringer-Lösung nach Robert (1975) in Gegenwart von 0,2% Triton-X-100 durch Auf- und Absaugen in einer Pasteur-Pipette bis zur Befreiung der Speicheldrüsenkerne homogenisiert. Anschließend wurde durch Nylongewebe filtriert. Das Kernpellet wurde in 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, mit 2% Natriumdodecylsulfat und 5% β -Mercapto-äthanol (Laemmli, 1970) aufgenommen, 5 min im Wasserbad gekocht; die gelösten und denaturierten Proteine wurden anschließend in Minicon B-15 Konzentratoren eingeeengt. Einzelheiten sind im Kapitel 3.1. dargestellt.

2.3. Elektrophorese

Die elektrophoretischen Auftrennungen der Kernproteine erfolgten auf Acrylamidgel in Gegenwart von SDS (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Platten-Apparatur mit Gel-Platten von 11,5 x 12,5 cm und einer Dicke von 1,5 mm. Je nach Fragestellung wurden entweder lineare Gradienten-Trenngele von 10-17%, 3-20% und 5-20% oder einfache Trenngele mit 10% Acrylamid-Konzentration verwendet. 5%ige Sammelgele sind für alle Elektrophoresen benutzt worden, außer in Verbindungen mit Gradientengelen 3-20%, wo das Sammelgel 3%ig war. Durch Einsetzen eines entsprechenden Kammes vor der Polymerisation wurden mehrere Geltaschen zur Aufnahme der Proben im Sammelgel geformt.

Um scharfe Proteintrennungen zu erreichen wurden die Proben in möglichst geringen Volumina und hoher Konzentration aufgetragen. Es wurde darauf geachtet, daß das Füllungs-niveau der Proben in den Gel-Taschen geringer als 2/3 der Höhe des Sammelgels war. Die Elektrophorese wurde mit vorgekühltem Elektrodenpuffer im Kühlschrank (+ 8°C) durchgeführt. Die Laufront der Elektrophorese wurde mit Bromphenolblau markiert. Es erwies sich als zweckmäßig, die Spannung zunächst während des Laufs im Sammelgel bei 50 V und während des Laufs im Trenngel bei 200 V konstant zu halten. Die Dauer der Elektrophorese betrug etwa 5 1/2 h. Die Stromversorgung erfolgte mit dem Beckman Duostat. Die Gele wurden anschließend mindestens 1 h in 20% TCA fixiert, für 4 h in 0,1 % Coomassie brilliant blue R 250 (25% Methanol, 7% Eisessig) gefärbt und anschließend in Entfärber (20% Äthanol, 20% Glycerin, 7% Eisessig) entfärbt. Die Elektropherogramme wurden auf Polaroid-Film (55 P/N) photographisch dokumentiert. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Mikro-Densitometer von Joyce-Loebl (NewCastle).

2.4. Galaktose-Behandlung von Chironomus pallidivittatus

Die Galaktose-Behandlung wurde entsprechend den Angaben von Beermann (1973) durchgeführt, d.h. 250 Tiere wurden in 2,5 l Kulturwasser (0,5% Galaktose, 0,06% NaCl) mit Zellstoff und wenig Futter angesetzt.

Alle drei Tage wurde die Galaktose-Lösung vorsichtig durch neue ersetzt. Um die Zuwachsrates der Mikroorganismen gering zu halten, wurden tote Imagines, geschwächte Larven und Puppen täglich abgesammelt.

Zur Kontrolle der Größe der Balbiani-Ringe 1, 2 und 6 während der Galaktose-Behandlung wurden täglich pro Kulturschale 10 Tiere für Quetschpräparate entnommen. Präparate der Speicheldrüsenchromosomen wurden in der üblichen Weise angefertigt (Bauer, 1945; Beermann, 1952; Keyl, 1959). Die Klassifizierung der Balbiani-Ring-Größen erfolgte nach Beermann (1973).

2.5. Hitzeschock bei Chironomus pallidivittatus

Larven des vierten Stadiums wurden für 10 min in 39°C warmer Kulturlösung gebracht und anschließend für verschiedene Erholungszeiten in 18°C Kulturlösung überführt (Yamamoto, 1970). Die Erholungszeiten bis zur Massenisolierung der Speicheldrüsen betrugen 1 1/2, 3 und 6 h. Zur Beurteilung der Balbiani-Ring-Größen wurden nach Ablauf der einzelnen Erholungszeiten Quetschpräparate hergestellt.

2.6. Kältebehandlung von Chironomiden-Larven

Chironomus pallidivittatus: Larven des vierten Larvenstadiums wurden 17 h bei 4°C gehalten und nach 2 h Erholungszeit bei 22°C (Stockert und Diez, 1979) zur Kernisolierung verarbeitet.

Glyptotendipes barbipes: Larven des letzten Stadiums wurden 5 Wochen bei 4°C gehalten und anschließend etwa 2 h bei 18°C stehen gelassen (Walter, 1973). Anschließend erfolgte die Massenisolierung der Kerne. Die Auflockerung der heterochromatischen Centromerenregion wurde mit Hilfe von Chromosomenpräparaten kontrolliert. Larven, die sich während der Kältebehandlung zur Vorpuppen entwickelt hatten, wurden nicht für die Versuche verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Reinigung der Zellkerne

3.1.1. Isolierung der Speicheldrüsen

Bereits 1968 hatten Ristow und Arends eine Methode zur Massenisolierung von Speicheldrüsen angegeben. Man erhält damit jedoch einen relativ großen Anteil verletzter Speicheldrüsen. Das dabei auslaufende Sekret aggregierte zusammen mit Bruchstücken der Drüsen und Darmteile zu einem unlöslichen Komplex, der die Reinigung der Zellkerne erschwerte. Für die hohe Ausbeute an einer sauberen Zellkern-Fraktion sind intakte Speicheldrüsen Voraussetzung.

Mit der hier neu beschriebenen Methode kann eine Person die Speicheldrüsen von etwa 1000 Tieren pro Stunde gewinnen, aus denen etwa 40% der Kerne rein erhalten werden.

Um Verunreinigungen durch Mikroorganismen und Futterrückstände zu entfernen, wurden die Tiere mindestens fünfmal in kalter isotonischer Kochsalzlösung (4°C, 0.06% NaCl) gewaschen. Mit zwei feinen Pinzetten wurden vorsichtig Röhren- und Zellstoffreste entfernt. Die Larven wurden vor der Präparation erneut kalt gespült (4°C, 5mal).

Bei Galaktose-behandelten Larven von Chironomus pallidivittatus wurden die oben beschriebenen Reinigungsschritte mit Galaktose-Kochsalzlösung durchgeführt (0,5% Gal, 0,06 NaCl).

Die Präparation der Tiere erfolgte auf einer sauberen Glasplatte über Eis. Mit einem kleinen Scalpell wurde routinemäßig hinter dem dritten Thorax-Segment geschnitten. Alle fünf Minuten wurden die geschnittenen Segmente in eisgekühlter Chironomus Ringer-Lösung nach Robert (1975) überführt (87 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.3). Dieser Rhythmus garantierte die Gewinnung von etwa 1000 Thorax-Segmenten pro Stunde. Die gesammelten Thorax-Segmente wurden durch mehrmaliges Spülen

von der Hämolymphe gereinigt. Bei Chironomus thummi thummi wurden je etwa 300, bei Chironomus pallidivittatus etwa je 200 Thorax-Segmente auf 5 ml diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten in einem Rotorbecher (swing-out) überschichtet. Der Saccharose-Gradient bestand aus vorsichtig übereinandergeschichteten Zonen von 1 ml 80%iger Saccharose, 3 ml 65%iger Saccharose und 0.5 ml 20%iger Saccharose. Nach 20 min Laufzeit (4°C, 35.000 UpM) der Zentrifuge konnten die intakten Speicheldrüsen in der Grenzschicht zwischen 65% und 80% Saccharose abgesammelt werden. Es war dabei notwendig, Rotoren der "swing-out"-Klasse zu benutzen, die sowohl eine höhere Effizienz (E) (Molloy und Rickwood, 1978) wie auch ein besseres Auflösungsvermögen (Λ) (Fritsch, 1973) ermöglichten.

Diese Parameter sind folgendermaßen festgelegt:

Die Effizienz wird definiert vom Faktor K, der proportional zum Sedimentationskoeffizienten S und der Sedimentationszeit t ist.

$$K = S \times t \quad (1)$$

Außerdem ist K durch die Laufgeschwindigkeit ω und die Dimension des Rotors festgelegt

$$K = \frac{(\ln R_{\max} - \ln R_{\min}) \times 2.78 \times 10^9}{\omega^2} \quad (2)$$

$$\Lambda = (r_2 - r_1) / (\sigma_2 + \sigma_1) \quad (3),$$

wobei r_2 und r_1 die Abstände zwei makromolekularer Zonen von der Rotor-Achse in einer bestimmten Zeit t sind und σ_1 und σ_2 die Standard-Abweichungen derselben Zeit.

Kleine K- und große Λ -Werte sind Charakteristika für die Qualität (Effizienz E, Auflösungsvermögen Λ) eines Rotors.

Auf Grund dieser Überlegungen und der Angaben des Herstellers wurden unter anderem die Rotor-Typen SW 65 Ti und SW 50.1 bzw. AH 650 (Du Pont Sorvall) benutzt.

Die Verwendung dieser Rotoren erbrachte bei den angegebenen Laufzeiten eine hohe Ausbeute (80%) von Speicheldrüsen guter Erhaltungsqualität und hoher Reinheit.

Modifikationen der Volumina und Konzentration der Saccharose-Schichten erbrachten dagegen keine Verbesserung im Vergleich zur Methode von Ristow und Arends (1968). In einem Volumenbereich von 2,5 bis 3 ml für die zweite Saccharose-Schicht (65%) konnten problemlos die Speicheldrüsen der untersuchten Chironomiden-Species und verschiedenen große Drüsen innerhalb des vierten Larvenstadiums isoliert werden. Herabsetzung des Volumens der obersten Saccharose-Schicht (20%) auf 0.3 ml ermöglichte die Verwendung einer größeren Zahl von Thorax-Segmenten in einem 5 ml-Zentrifugenröhrchen (bis ca. 400 von Chironomus thummi thummi und etwa 300 bei Chironomus pallidivittatus).

Die Trennung der Speicheldrüsen von den Thorax-Segmenten erfolgte im wesentlichen während der Sedimentation in der zweiten Saccharose-Schicht (65%). Die dabei auftretenden osmotischen Kräfte brachten allerdings den Nachteil mit sich, daß die Zellen schrumpften. Die mikroskopische Beobachtung von Zellkernen dieser Zellen zeigte jedoch keine auffällige Veränderung in der Morphologie der Kernmembranen und der Chromosomen.

Alle nachfolgenden Reinigungsschritte erfolgten ebenfalls bei 4°C. Die Speicheldrüsen-Fraktion wurde zunächst mit einer, mit Feuerpolierter Spitze (Öffnungsdurchmesser 7 mm), Pipette auf eine kleine Petrischale übertragen, damit eventuell noch vorhandene einzelne Thorax-Segmente unter dem Binokular ausgelesen werden konnten. Nach Übertragen der Speicheldrüsen-Fraktion in ein Reagenzglas (10 ml Volumen)

konnte durch differentiellles Mischen und Sendimentieren stufenweise die Saccharose-Konzentration zurückgenommen werden, bis die Drüsen sich Saccharose-frei in Ringer-Lösung nach Robert (1975) pH 7.3 befanden. Da die Drüsen intakt isoliert wurden, war in ihrem Lumen Sekret enthalten. Sobald die Drüsen Saccharose-frei waren, war auslaufendes Sekret zu beobachten, das anhängende Drüsen zu einem Komplex verklebte. Die Entfernung des Sekrets war notwendig, um die Homogenisierung zur Gewinnung der Zellkerne durchführen zu können.

Nach wiederholtem Aufsaugen der Drüsen in eine große Pasteur-Pipette floß das Sekret aus dem Lumen der Drüsen heraus. Die dadurch größer werdende Sekretmasse wurde in ein weiteres Reagenzglas übertragen, wo die anhaftenden Drüsen durch weiteres Pipettieren abgelöst werden konnten. Die sekretfreien Drüsen sendimentierten und konnten anschließend gesammelt werden. Abb. 1 und 2 zeigen Beispiele der intakten Speicheldrüsen im gereinigten Zustand. Diese Fraktion wurde zur Isolierung der Zellkerne verwendet.

3.1.2. Kernisolierung und Ausbeute an Kernproteinen

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden im Phasen-Kontrast-Mikroskop kontrolliert.

Die gereinigten Speicheldrüsen wurden zunächst in Chironomus-Ringer-Lösung nach Robert (1975), die 0.2% Triton-X-100 enthielt, übertragen und während dieser Zeit mehrere Male durch Aufsaugen in einer weiten silikonisierten Pasteur-Pipette gemischt (300 Drüsen pro ml, 4°C). Durch diesen Vorgang wurden die Drüsen weicher, und sie konnten nach Erneuerung der Triton-X-100-Lösung leichter mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette homogenisiert werden.



Abb. 1:

Beispiel einer Massenisolierung von intakten Speicheldrüsen bei C. pallidivittatus (Maßstab 2 mm)

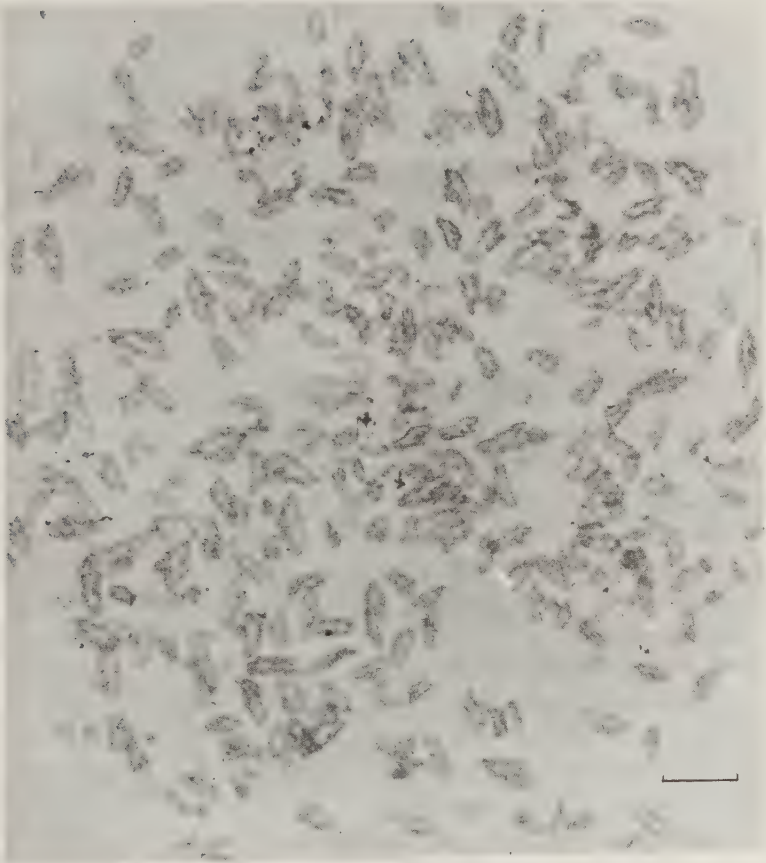


Abb. 2:

Beispiel einer Massenisolierung von intakten Speicheldrüsen von C. thummi thummi (Maßstab 2 mm)

Die Homogenisierung von sekretfreien Speicheldrüsen erfolgte durch Scherkräfte während der Pipettierung mit einer feuerpolierten silikonisierten Pasteur-Pipette. Engere Pipetten (Robert, 1975) konnten nicht erfolgreich benutzt werden, da sich Sekret-Komplexe bildeten. Diese entstehen möglicherweise dadurch, daß cytoplasmatische Sekret-Granula (Beermann, 1961) zusammen mit cytoplasmatischen Strukturen, die durch die Saccharose-Einwirkung erhärtet werden (Robert, 1975) zusammenkleben. Diese Komplexe wurden im Anfangsstadium entfernt, um eine gleichmäßige Homogenisierung der Drüsen zu erleichtern.

Durch vorsichtiges weiteres Pipettieren der Drüsen wurden die Kerne fast quantitativ freigelegt. Durch Filtrierung durch Nylongewebe (Maschenweite 100 µm bei Chironomus thummi, 120 µm bei Chironomus pallidivittatus und Glyptotendipes barbipes) erfolgte die Grobreinigung der Zellkerne. Nach etwa 5 min weiterer Einwirkung der Triton-X-100-haltigen Ringer-Lösung (pH 7.3) wurde das Filtrat mit Triton-X-100-freier Chironomus-Ringer-Lösung (pH 6.3) vierfach verdünnt (Robert, 1975). Eventuell noch anhaftende cytoplasmatische Reste konnten durch erneute Filtration durch Nylongewebe gleicher Maschenweite und gleichzeitiger Einwirkung von Triton X-100 Lösung (0.02% Triton X-100 in Chironomus-Ringer-Lösung, pH 6.3) entfernt werden. Durch dreimaliges Waschen mit Triton X-100 Chironomus-Ringer-Lösung (pH 6.3) und anschließender Zentrifugation (1000 UpM, 10 min, Heraeus Minifuge II) wurden die Kerne quantitativ gereinigt (Ausbeute von Zellkernen von den sekretfreien Drüsen etwa 60%). Dieser Reinigungsvorgang wurde mikroskopisch kontrolliert (Abb. 3).

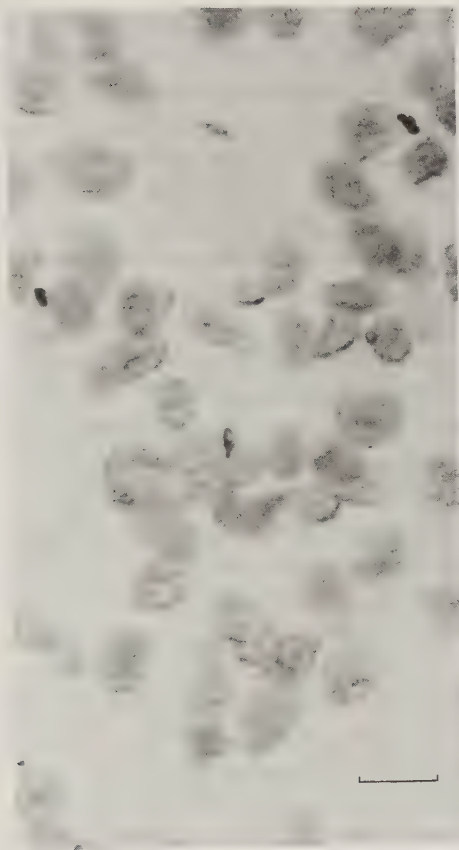


Abb. 3:

Beispiel isolierter polytärer Zellkerne aus den Speicheldrüsen von C. thummi thummi nach der Reinigung, lebend, nicht gequetscht (Maßstab 60 µm)

Zur Verflüssigung der inneren cytoplasmatischen Zone der Speicheldrüsenzellen (Edström und Lönn, 1976; 1980) wurde 0.02 EDTA, 0.01 M Tris-HCl pH 8 auf pH 6.3 geeicht mit 0.05 M NaHSO₃ nach Holmgren (1976) verwendet, um die Polysomen zu dissoziieren und dabei die geringfügigen Kontaminationen bei der Kernisolierung zu entfernen (Daneholt et al., 1977; Serfling und Huth, 1978). Vergleichende elektrophoretische Analysen der Kernproteine mit und ohne diesen EDTA-Waschvorgang zeigten jedoch keine Veränderung des elektrophoretischen Proteinmusters.

Ebenso erbrachte ein Reinigungsschritt durch Einmischung der Kerne in 1.7 M Saccharose und Unterschichtung von 1 ml 2.3 M Saccharose in einem Zentrifugenröhrchen (Volumen 5 ml, Verhältnis 2.3 M Saccharose: 1.7 M Saccharose = 1:4) und anschließende Zentrifugierung (SW 50.1, 25.000 UpM, 1 h) nach Abänderung der Vorschrift von Elgin und Boyd (1975) keine Veränderung des elektrophoretischen Musters.

Daher wurde bei der Präparation der Kerne für die weiteren Versuche auf die beiden letzten Reinigungsschritte verzichtet.

Das Kern-Pellet wurde in 1 ml Probepuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% Sucrose) und 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt (Maizel, 1969) und anschließend wieder bei 4°C in Minicon B-15 Konzentratoren (Ausschlußgrenze: 15.000 Dalton) eingeeengt (bis ca. 1.2 µg/µl Protein) bzw. für spätere Elektrophoresen bei -70°C eingefroren. Diese Aufbewahrung sowie das Kochen mit 5% β-Mercaptoäthanol im Laemmli-Proben-Puffer erbrachte keine Veränderungen der Protein-Elektropherogramme.

Die proteolytische Aktivität während der Kernisolierung wurde bei 4°C als geringes Problem gefunden. Testversuche mit und ohne 0.005 M Phenylmethylsulphonylfluoride (Serva) in allen Schritten der Methode wiesen ebenfalls keine Musterveränderung der elektrophoretischen Analysen auf. Dagegen trat bei Zimmertemperatur ein wesentlicher Abbau von vielen Polypeptiden auf, die in einer höheren Mobilität in SDS-PAGE liefen.

Aus 500 präparierten Larven von Chironomus pallidivittatus konnten durch die Massenisolierung mittels Zentrifugation etwa 80% der Drüsen erhalten werden. Davon wiederum gingen maximal 15% der Drüsen während der quantitativen Sekret-Entfernung verloren, d.h. daß etwa 650 intakte Drüsen homogenisiert wurden. Während dieses Vorgangs und der anschließenden Kernisolierung gingen etwa 40% der Kerne verloren. Da eine Drüse aus etwa 35 Zellen besteht, stehen pro Standard-Präparation etwa 14.000 gereinigte Zellkerne zur Kernprotein-Isolierung zur Verfügung. Nach densitometrischen Vergleichsmessungen bekannter Proteine (Bio-Rad Standards, vgl. Abb. 8) enthielt eine feine Bande etwa 0.2-0.5 µg Protein und eine dickere Bande etwa 1.5-2.0 µg Protein. Aus der Anzahl der Proteinfractionen per Laufstrecke und deren densitometrischen Bestimmungen konnte die Proteinmenge einer elektrophoretischen Auftrennung auf ca. 30-40 µg geschätzt werden. Auf Grund des pro Probentasche aufgetragenen Probenvolumens von 25 µl und des Gesamtvolumens der Proben nach Minicon-B-15-Konzentrierung konnte pro Standard-Präparation (14.000 Kerne) aus 500 Tieren etwa 150-200 µg Kernprotein erhalten werden. Das ergibt pro Zellkern etwa 10-14 ng Protein. Damit sind pro elektrophoretischer Laufstrecke die Proteine von etwa 2000 Zellkernen in einer Konzentration von ungefähr 1.2 µg/µl aufgetragen worden. Tanguay und Nicole (1980) erhielten mit 9 ng Protein pro Kern zwar einen kleineren Gehalt an Kernproteinen, da aber in dem von ihnen benutzten elektrophoretischen System die Histone nur als Front-Bande erschienen und in den Berechnungen nicht mit einbezogen wurden, ist die Abweichung erklär-

bar. Diese Zahlenangaben sind als Durchschnittswerte anzusehen, da bekanntlich die Kerngrößen innerhalb einer Drüse und bei verschiedenen Individuen variieren.

3.2. Die Kernproteine der larvalen Speicheldrüsen bei Chironomiden-Arten mit unterschiedlichem Gehalt an Heterochromatin

Aus der Vielfalt der Kernproteine sollten bestimmte "Heterochromatin"-spezifische Proteine identifizierbar sein, wenn einzelne Chironomiden-Arten mit unterschiedlichem "Heterochromatin"-Gehalt durch vergleichende elektrophoretische Analysen untersucht werden. Solche Chironomiden sind z.B. C. thummi thummi, C. thummi piger, Glyptotendipes barbipes und C. pallidivittatus. Bevor dieser Vergleich durchgeführt werden konnte mußte sichergestellt sein, daß das Muster der Kernproteine in der eindimensionalen Gelelektrophorese im Verlauf des mittleren und späten vierten Larvenstadiums im wesentlichen konstant bleibt.

Im vierten Larvenstadium entwickeln sich die polytären Chromosomen der Speicheldrüsen von Chironomiden nicht synchron und weisen eine entwicklungsspezifische Variation der Puff-Muster auf (Clever, 1962; Pelling, 1964). Da aus technischen Gründen der Massenisolierung die Verwendung von datierten Larven nicht möglich war und um sicherzugehen, daß während der Präparation keine entwicklungsspezifischen Kernprotein-Muster erfaßt werden konnten, wurden bei C. thummi thummi und C. pallidivittatus verschieden große Tiere des vierten Larvenstadiums ausgelesen und parallel verarbeitet zur Herstellung von Kernproteinen. Dabei wurden durchschnittlich am häufigsten Larven aus dem mittleren und späten IV. Larvenstadium erfaßt.

Der Vergleich dieser beiden Tiergruppen wird in Abb. 10 (Gradientengel 10 - 17.5%) und in Abb. 13 (10%iges Trenngel) gezeigt. Bei beiden Auftrennungen konnten keine quantitativen Unterschiede erkannt werden. Deshalb wurden alle großen Tiere des vierten Larvenstadiums für die einzelnen Präparationen ausgelesen, wobei pro Analyse circa 500 Tiere verwendet wurden.

Heterochromatin-spezifische DNA von C. thummi thummi bindet in situ an spezifische Proteine in heterochromatischen Banden und Centromeren der "DNA-depleted" Riesenchromosomen in Speicheldrüsen von C. thummi thummi und Glyptotendipes barbipes (Schmidt und Keyl, 1981). Es wurde daher untersucht (in Zusammenarbeit mit Schmidt, Bochum; Schmidt et al., 1980; Schmidt, 1980; Schmidt, 1981), heterochromatin-spezifische Proteinfractionen in den Elektropherogrammen durch Bindungsstudien mit heterochromatin-spezifischer, AT-reicher DNA zu identifizieren.

3.2.1. Vergleichende elektrophoretische Analyse der Proteine aus den Speicheldrüsenkernen von Chironomus-Arten

3.2.1.1 Chironomus thummi thummi und Chironomus thummi piger

Bei C. thummi thummi liegt der DNA-Gehalt in den Speicheldrüsenkernen etwa 27 % über dem von C. thummi piger, was morphologisch in der unterschiedlichen Dicke von homologen Chromomeren in den ungepaarten kinetochornahen Regionen der Riesenchromosomen zum Ausdruck kommt (Keyl, 1965a).

Die mikrospektrophotometrischen Messungen von Keyl an 30 Querscheiben der polytären Speicheldrüsenchromosomen ergaben Unterschiede im DNA-Gehalt sowohl zwischen verschiedenen Stämmen von C. thummi thummi als auch zwischen den beiden Unterarten C. thummi thummi und C. thummi piger.

In diesen Querscheiben enthalten die Riesenchromosomen von C. thummi thummi jeweils die 2-, 4-, 8- oder 16fache DNA-Menge der homologen Querscheiben von C. thummi piger (Keyl, 1965a, b). Chromomeren von C. thummi thummi mit gegenüber der Nachbarform erhöhtem DNA-Gehalt reagieren positiv auf eine modifizierte Giemsa-Färbung, während bei C. thummi piger nur die Centromeren selbst angefärbt werden (Hägele, 1977a).

Wegen der großen Ähnlichkeit in Morphologie und Funktion der larvalen Speicheldrüsen der beiden Unterarten bei gleichzeitigem Auftreten definierter chromosomaler Unterschiede im Heterochromatin-Gehalt lag es nahe, die Proteine der isolierten Speicheldrüsen-Kerne elektrophoretisch zu vergleichen, in der Erwartung, etwaige Unterschiede im Proteinmuster mit den chromosomalen Eigenschaften der beiden Unterarten in Verbindung bringen zu können.

Die Elektrophorese der in Natriumdodecylsulfat (SDS) gelösten Kernproteine auf Acrylamidgelen in Gegenwart von SDS ergab bei C. thummi thummi 75, bei C. thummi piger 73 Fraktionen (Abb. 4).

Die Einteilung der Vielzahl der Banden erfolgte nach nachfolgender Nomenklatur; als Grenzen zwischen etwa gleich breiten Abschnitten wurden dabei auffällige "leere" Stellen gewählt (Abb. 5). C. thummi thummi: A₁₋₁₂, B₁₋₁₄, C₁₋₁₅, D₁₋₁₁, E₁₋₁₂, F₁₋₁₁; C. thummi piger: A₁₋₁₃, B₁₋₁₃, C₁₋₁₄, D₁₋₁₀, E₁₋₁₂, F₁₋₁₁.

Es fällt auf, daß fast alle Fraktionen der Kernproteine bei beiden Unterarten übereinstimmten. Dies ist auf Grund der Homologie der Querscheiben der Chromosomen (Keyl, 1965a) und der übereinstimmenden Funktion der Speicheldrüsen nicht unerwartet, zumal bei der eindimensionalen Elektrophorese nur die quantitativ hervortretenden Proteine erfaßt werden. Bei genauerer Betrachtung (vgl. Abb. 4 und Abb. 8) fallen jedoch folgende Unterschiede auf:

In den Speicheldrüsenkernen von C. thummi piger konnte die Fraktion F_8 in quantitativ größerer Menge nachgewiesen werden als aus C. thummi thummi-Kernen. Dies zeigte auch das Densitogramm der Abb. 6.

Im Bereich D_6 - D_7 war bei C. thummi piger nur die Bande D_6 nachweisbar. Bei C. thummi thummi dominierte dagegen die Bande D_7 , und die Bande D_6 war nur andeutungsweise nachweisbar. In einer weiteren Probe der gleichen Unterart C. thummi thummi konnten beide Fraktionen in etwa gleicher Konzentration nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4, 6, 7 und 8).

Im Bereich der Fraktion C_{15} war ein quantitativer Unterschied nachweisbar. Bei C. thummi thummi war C_{15} die prominenteste Bande der Tetrade C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} . Bei C. thummi piger war diese Bande deutlich schwächer ausgeprägt, wie es aus der Abb. 7 zu entnehmen ist.

Quantitative planimetrische Messungen der entsprechenden Flächen der Fraktion C_{15} bei beiden Unterarten zeigten ein Verhältnis von etwa 1 : 3 (piger : thummi).

Die Fraktion C_4 war nur in den Elektropherogrammen von C. thummi thummi nachweisbar.

Im Bereich A_6 - A_7 - A_8 waren die quantitativen Unterschiede bei C. thummi thummi und C. thummi piger möglicherweise auf den unterschiedlichen DNA-Gehalt der beiden Unterarten und daher auch der Proben zurückzuführen. Bei den einzelnen Laufstrecken der Abb. 4 und Abb. 8 war nämlich jeweils die gleiche Proteinmenge aufgetragen worden. Da darüber hinaus bei beiden Proben der gleiche Konzentrierungsfaktor angewendet wurde, war der "Schmiereffekt" bei C. thummi thummi auf den ca. 27% höheren DNA-Gehalt zurückzuführen. In einer nicht

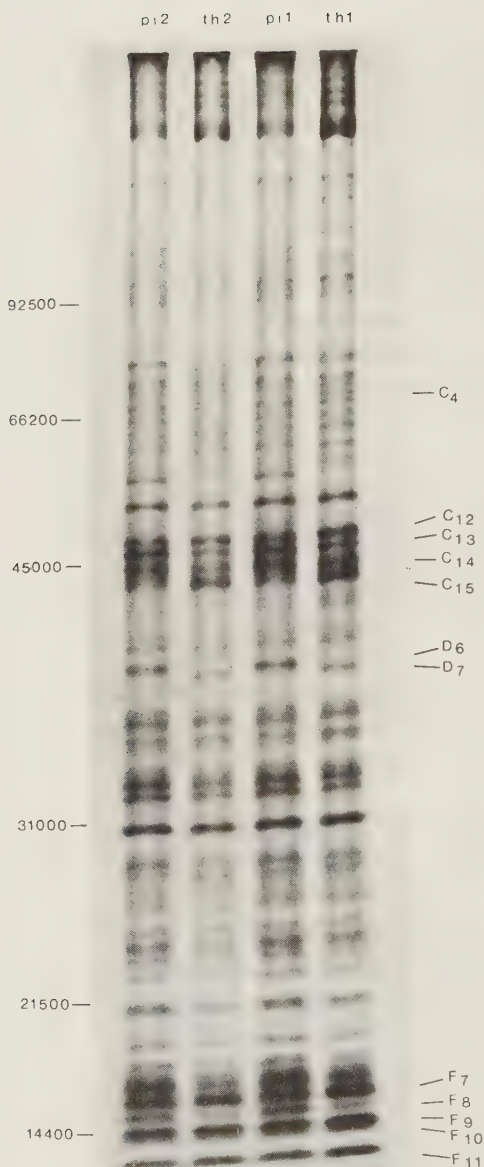


Abb. 4:

Zwei unabhängige Vergleiche der Kernproteine von *C. thummi thummi* (th 1, th 2) und *C. thummi piger* (pi 1, pi 2) im linearen SDS-PAGE (10 - 17.5%). Die Molekulargewichte sind aus Abb. 8 übertragen. Die Nomenklatur der Proteinfractionen ist teilweise rechts angegeben.

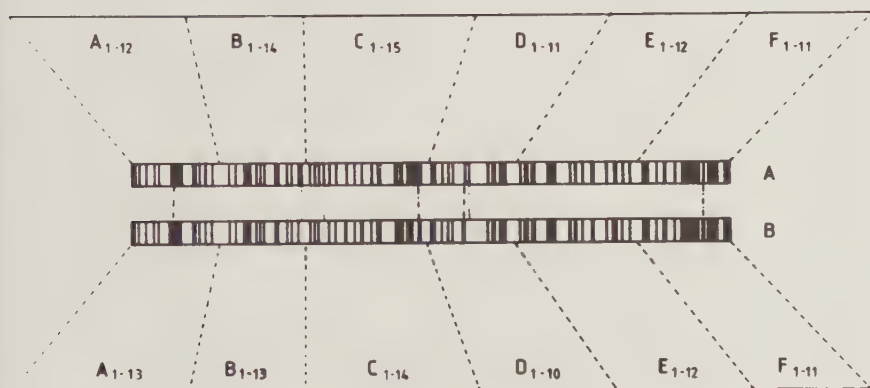


Abb. 5:

- A. Nomenklatur der Fraktionen bei C. thummi thummi aus th 1 der Abb. 4;
- B. Nomenklatur der Fraktionen bei C. thummi piger aus pi 1 der Abb. 4.

Die wesentlichen quantitativen Unterschiede, z. B. C 15, D 6 und F 8 sind mit (---) wiedergegeben, neue Fraktionen (qualitative Unterschiede), z.B. C 4, D 7 sind mit (....) gekennzeichnet.

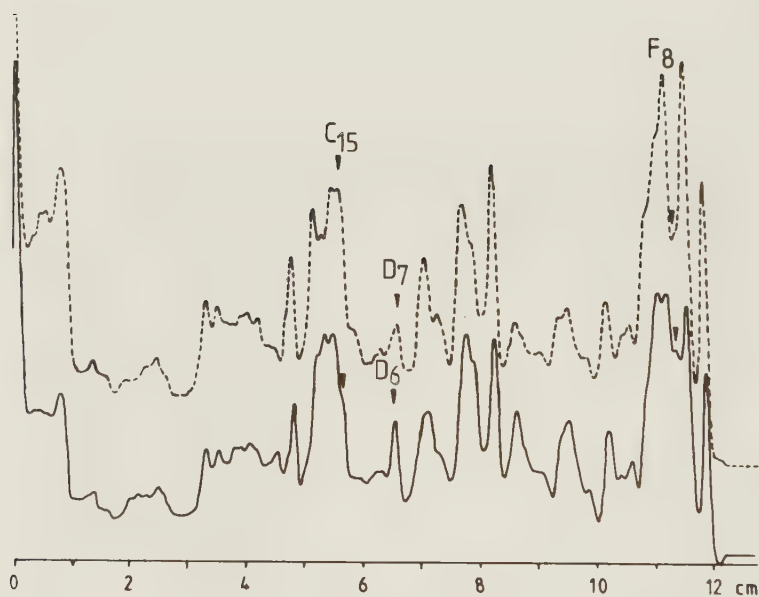


Abb. 6:

Densitogramme der Laufstrecken th 1 (---) und pi 1 (—) der Abb. 4. Die Pfeile (↗) markieren die Unterschiede im Bereich der Fraktionen C 15, D 6 - D 7 und F 8 bei den untersuchten C. thummi Unterarten. Die Laufrichtung ist von links nach rechts.

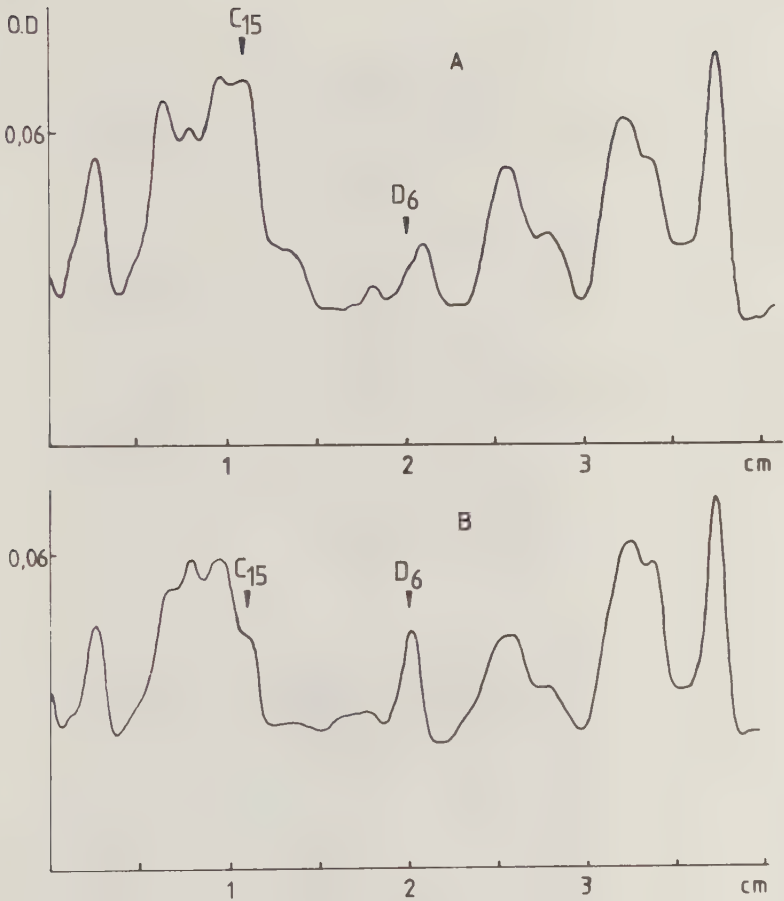


Abb. 7:

Densitogramm von C. thummi thummi (A) und C. thummi piger (B) im Bereich C 10 - E 4 aus Laufstrecken th 1, pi 1 mit größerem Auflösungsvermögen. Die Pfeile (⇓) markieren die quantitativen Unterschiede der Fraktionen C 15 und D 6.

parallel verarbeiteten Probe von C. thummi thummi aus in-
gezüchteten Larven, wo die DNA mehrfach durch Scherkräfte
und wiederholte Dialyse im Minicon B-15 Konzentrador aus-
gewaschen wurde, trat dieser Effekt nicht auf (Abb. 8).

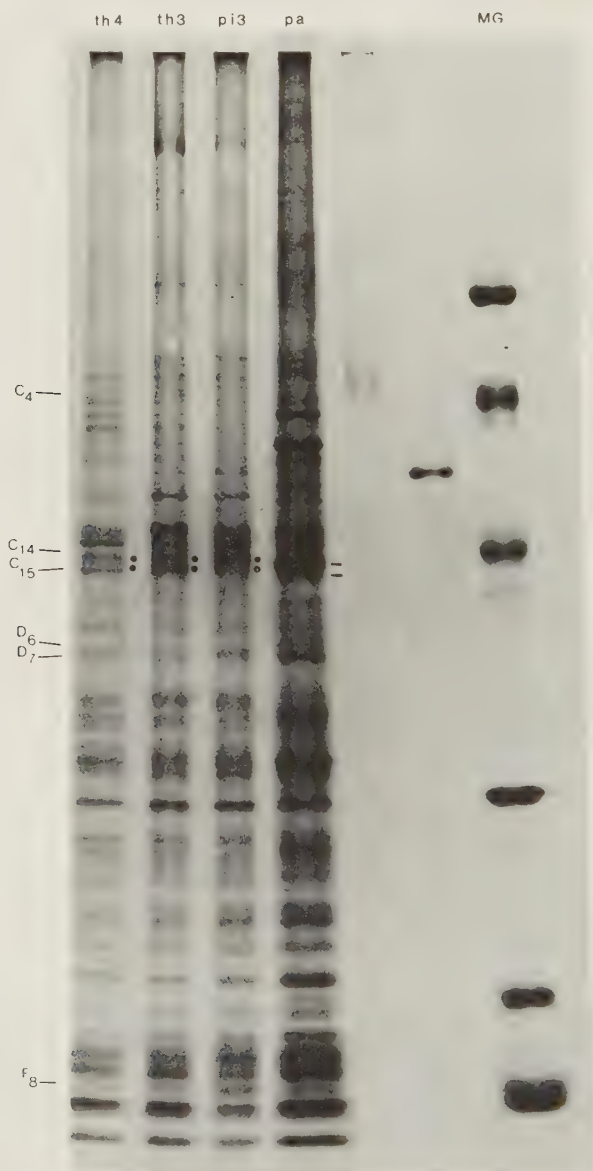


Abb. 8

Abb. 8:

Vergleichende elektrophoretische Auftrennung der Speicheldrüsen Kernproteine von C. pallidivittatus (pa), C. thummi piger (pi 3), C. thummi thummi (th 3 und th 4) zu verschiedenen Präparations-Zeitpunkten im linearen Gradienten-Gel 10 - 17.5%.

1. C 4 nur bei C. thummi thummi vorhanden.
2. C 14 und C 15 laufen sowohl bei C. thummi thummi wie auch bei C. thummi piger nicht exakt parallel mit C. pallidivittatus (-). Der quantitative Unterschied von C 15 zwischen C. thummi thummi (●) und C. thummi piger (○) ist gekennzeichnet.
3. Bei C. thummi piger ist nur D 6 identifizierbar. Im Bereich D 6 - D 7 ist bei C. pallidivittatus eine geringfügig langsamere Fraktion nachgewiesen als D 7 bei C. thummi thummi.
4. F 8 ist bei C. pallidivittatus schwächer ausgeprägt als bei C. thummi thummi und hier wiederum schwächer als bei C. thummi piger. Die Molekulargewichtsmarker (Bio-Rad) zeigen von oben nach unten Phosphorylase B (92.500 D), Rinderserum Albumin (66.200 D), Ovalbumin (45.000 D), Carboanhydrase (31.000 D), Soybean Trypsin Inhibitor (21.500 D), Lysozym (14.500 D).

Bei einer Probe aus einer Freilandpopulation von C. thummi aus Nörten-Hardenberg wurde eine auffällige quantitative Erhöhung des Anteils der Fraktion C₁₅ gefunden (Abb. 9). Leider stand hier nur Material für eine einzige Elektrophorese zur Verfügung. Im Zusammenhang der übrigen Ergebnisse, die eine starke Variation der Quantität C₁₅ bei verschiedenen Chironomiden (vgl. auch 3.2.2) und eine spezifische Bindungsaffinität dieser Fraktion an eine AT-reiche heterochromatin-spezifische thummi thummi-DNA (vgl. 3.2.3) ergeben haben, ist dieser Einzelbefund trotzdem erwähnenswert.

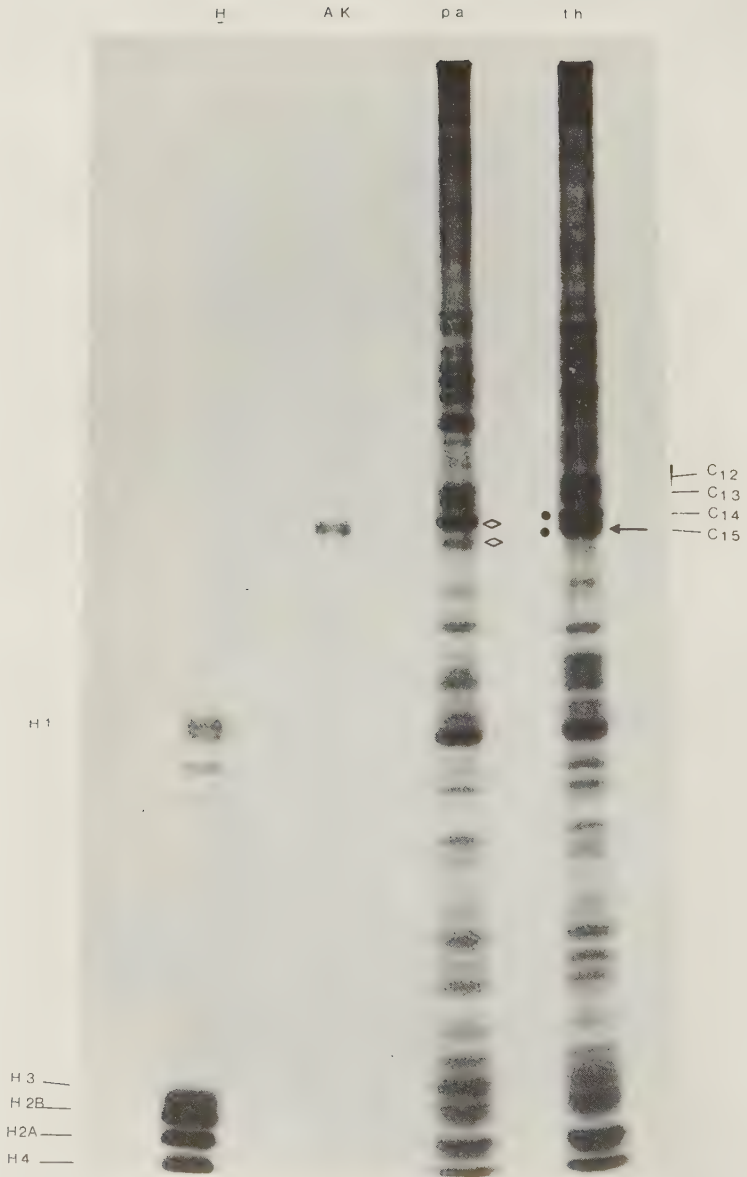


Abb. 9

Abb. 9:

Vergleichende elektrophoretische Analyse der Speicheldrüsen-Kernproteine von C. thummi thummi (Norddeutsche Freilandpopulation aus Nörten-Hardenberg, th) und C. pallidivittatus (pa). 10% Trenngel. Mit → ist die Stelle der Fraktion C 15 markiert. Die Fraktionen C 14 und C 15 (●) bei C. thummi thummi laufen nicht parallel mit denen von C. pallidivittatus (∞) (vgl. Abb. 8). (AK) = Kaninchen Muskel-Aktin (M.G. um 42.000 D), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. K. Zechel (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen). H = Kalbsthymus-Gesamt-Histon.

3.2.1.2 Chironomus pallidivittatus

Neben der Identifizierung von Unterschieden im Muster der Kernproteine zwischen C. thummi thummi und C. thummi piger war es interessant, die Kernproteine bei den Speicheldrüsen von C. pallidivittatus zu überprüfen, da in diesen bisher kein Heterochromatin nachgewiesen werden konnte (Steinemann, 1978). Abb. 8 zeigt ein typisches Elektropherogramm der Proteine aus Speicheldrüsenkernen von C. pallidivittatus im Vergleich zu C. thummi thummi und C. thummi piger.

Dabei fällt auf, daß die Anzahl der Proteinbanden eine große Homologie zu den Kernproteinen von C. thummi thummi aufwies, vor allem bei den niedrigen molekularen Fraktionen D, E und F.

Die prominenten Banden der Kernproteine von C. pallidivittatus stimmten fast völlig mit den Proteinfractionen der C. thummi Unterarten überein.

Bei dem Vergleich mit jenen Proteinbanden, die bei den beiden Unterarten von C. thummi Variationen aufwiesen, konnten bei C. pallidivittatus ebenfalls Musterunterschiede festgestellt werden. Diese betreffen hauptsächlich die folgenden Fraktionen:

F₈: Diese Bande war bei C. pallidivittatus wesentlich schwächer ausgeprägt. Dies wird vor allem in Abb. 10 deutlich.

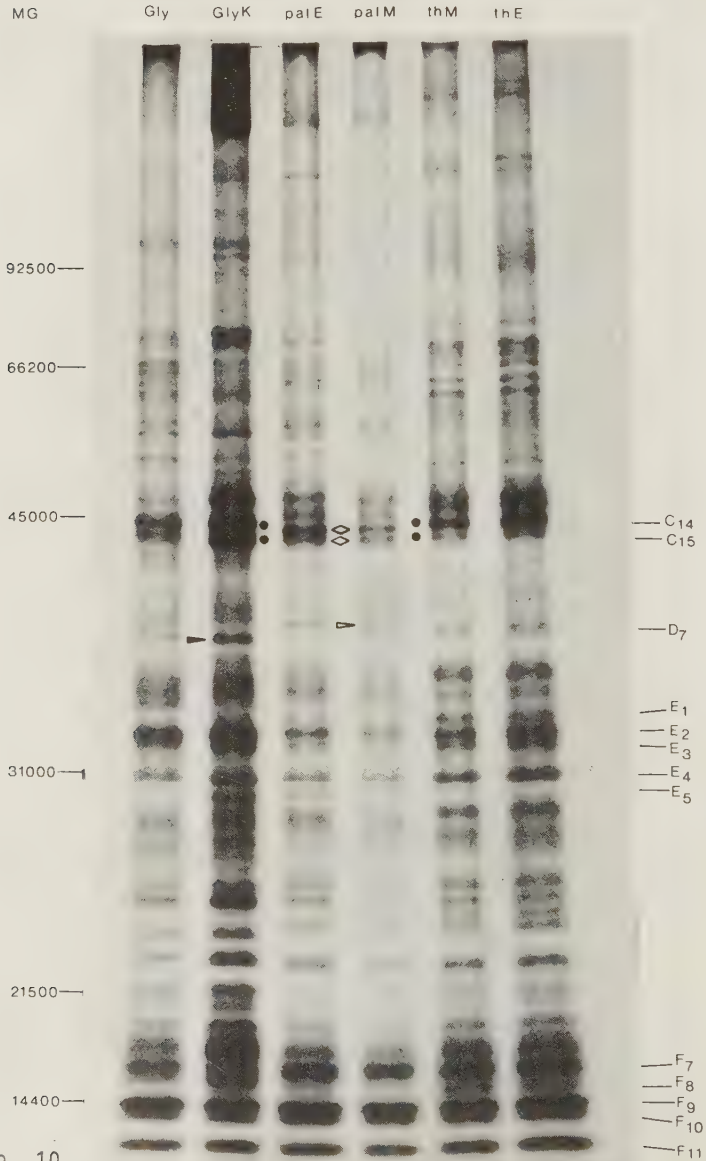


Abb. 10

Abb. 10:

Vergleichende elektrophoretische Auftrennung der Speicheldrüsen Kernproteine im linearen Gradienten Gel (10 - 17.5%) folgender Chironomiden von links nach rechts:

G. barbipes, (Kontrolle Gly), G. barbipes nach Kältebehandlung (GlyK), C. pallidivittatus, Ende des IV. Larvenstadiums (palE), C. pallidivittatus, Mitte des IV. Larvenstadiums (palM), C. thummi thummi Süddeutsche Freilandpopulation, Mitte des IV. Larvenstadiums (thM), C. thummi thummi, dieselbe süddeutsche Freilandpopulation, Ende des IV. Larvenstadiums (thE).

1. Die Zonen C 14 und C 15 bei C. thummi thummi (●) laufen nicht exakt parallel mit denjenigen von C. pallidivittatus (◊) (vgl. Abb. 8 und 9), Parallelität ist erkennbar bei G. barbipes (Gly und GlyK) und C. thummi thummi in den Fraktionen C 14 und C 15.
2. Im Bereich D 6 - D 7 ist bei C. pallidivittatus eine deutliche Fraktion mit geringfügig langsamerer Mobilität (◄) als D 7 bei C. thummi thummi. Bei G. barbipes ist in diesem Bereich eine Fraktion mit geringfügig schnellerer Mobilität (►) als D 7 bei C. thummi thummi nachgewiesen.
3. Identität von palE und palM sowie thM und thE.
4. GlyK zeigt in der parallelen Fraktion zu C 15 eine relative Zunahme zur Kontrolle Gly.
5. Fraktion E 5 in GlyK ist neu, relativ zur Gly, feine Präsenz auch in C. pallidivittatus (vgl. Abb. 26).
6. F 8 bei C. thummi thummi stärker als bei C. pallidivittatus und GlyK stärker als in Gly.
7. Volle Übereinstimmung der Fraktionen F 7, F 9, F 10 und F 11 zwischen verschiedenen Chironomus-Arten (Nucleosom Histone?; H 3, H 2B, H 2A, H 4?).

D₆ - D₇: Bei C. pallidivittatus war im Bereich D₇ keine exakte Parallelität zu C. thummi thummi D₇ feststellbar. Es fiel jedoch auf, daß im gleichen Bereich eine Fraktion geringfügig langsamer gelaufen war (Abb. 8, 10 und Abb. 13).

Tetrade $C_{12} - C_{13} - C_{14} - C_{15}$: In diesem Bereich wiesen die Banden C_{14} und C_{15} bei C. pallidivittatus eine geringfügig höhere Mobilität als bei C. thummi thummi und C. thummi piger auf (Abb. 8, 10 und Abb. 13).

Bereich C_4 : Bei C. pallidivittatus fehlte diese Bande ebenso wie bei C. thummi piger (Abb. 8).

In Abb. 10 und Abb. 13 wurden Kernproteine aus einer Präparation von C. thummi thummi der süddeutschen Population und C. pallidivittatus in verschiedenen elektrophoretischen Auftrennungen verglichen.

Im Bereich der angesprochenen Tetrade $C_{12} - C_{13} - C_{14} - C_{15}$ war die schnellste Fraktion C_{15} in allen unabhängigen Kernprotein-Isolierungen von süddeutschen Populationen nicht als stärkste der Tetrade ausgeprägt, wie auch die Abb. 10 zeigt. Dies stand im Gegensatz zu den Protein-Konzentrationen in diesem Bereich $C_{12} - C_{13} - C_{14} - C_{15}$ in der norddeutschen Population (Nörten-Hardenberg), wo C_{15} bei weitem als die stärkste Fraktion der Tetrade ausgeprägt war (vgl. Abb. 9). Beim Vergleichen der einzelnen Abb. 4, 8, 9 und 10 wurde deutlich, daß vor allem die Bande C_{15} quantitative Unterschiede innerhalb der verwendeten C. thummi thummi Populationen aufweist.

Die Auflösung der Kernproteintrennung erwies sich als höher im Bereich der oben genannten Tetrade in 10%igen Gelen als in Gradienten Gelen (10 - 17.5 Acrylamid) (Abb. 9 und Abb. 13). Dabei wurde deutlich, daß bei C. pallidivittatus ausnahmsweise nur eine homologe Bande zur C. thummi thummi C_{15} unterrepräsentiert vorhanden war (Abb. 13), und zwar noch schwächer als bei C. thummi piger (Abb. 4 und 8).

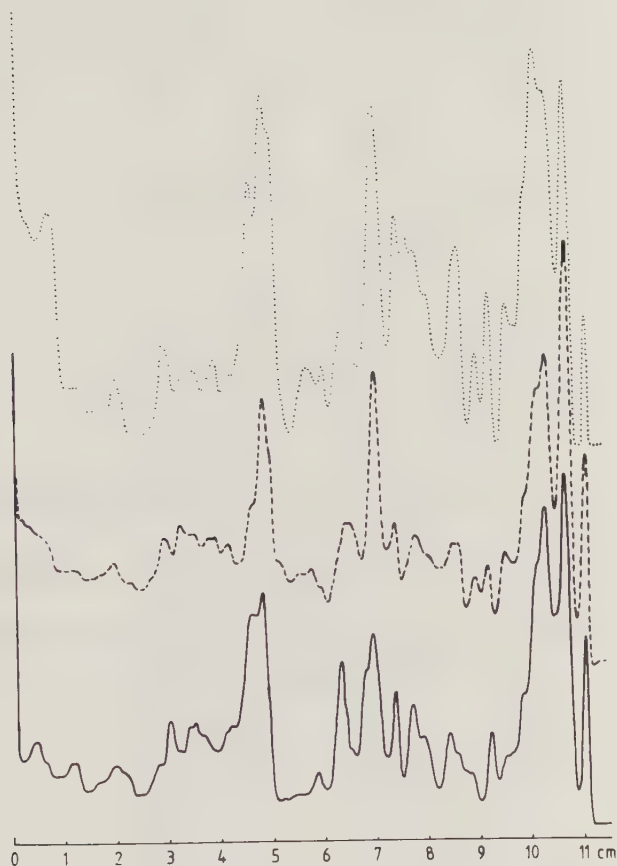


Abb. 11:

Densitometrische Darstellung der Laufstrecken der Abb. 10;
von unten nach oben, thE (—), Gly (---) und GlyK (....).
Die Laufrichtung ist von links nach rechts.

Die Fraktion C₁₅ verdient besonders Interesse auch deshalb, weil eine entsprechende Bande auch unter den Kernproteinen der besonders heterochromatin-reichen Chironomide Glyptotendipes barbipes gefunden wurde (vgl. 3.2.2), und weil sie eine AT-reiche heterochromatin-spezifische DNA-Fraktion von C. thummi thummi spezifisch bindet (vgl. 3.2.3).

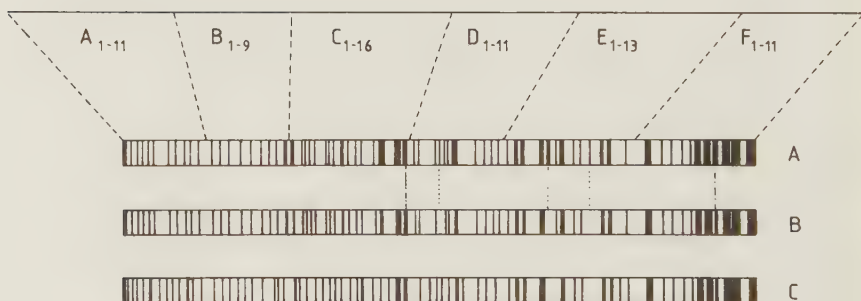


Abb. 12:

Zeichnung der Laufstrecken der Abb. 10, thE (C), Gly (B) und GlyK (A). Mit (---) und (...) sind die quantitativen und qualitativen Unterschiede nach der Kältebehandlung dargestellt. E 5 liegt im Molekulargewichtsbereich von 29.000 D. - C 16 nach der G. barbipes Nomenklatur entspricht der C 15 bei C. thummi thummi.

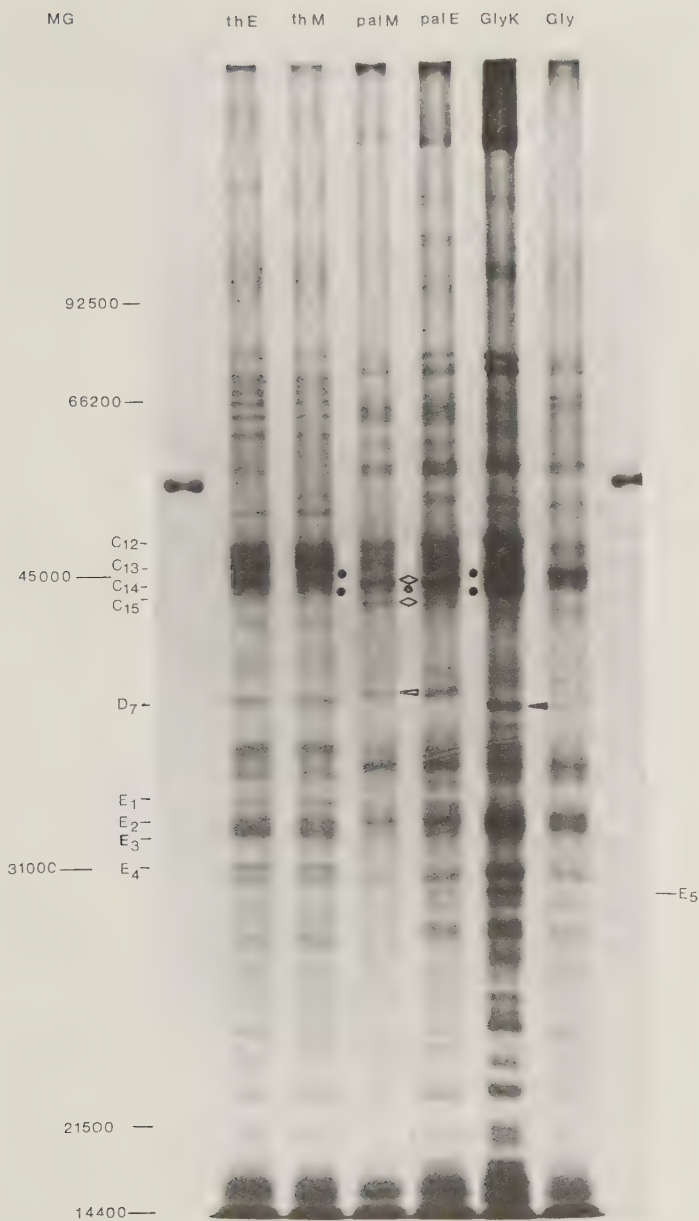


Abb. 13

Abb. 13:

Die gleichen Proben der Abb. 10 in 10%igem Trenngel aufgetrennt. Von links nach rechts: thE, thM, palM, palE, GlyK, Gly. Die Histone sind offensichtlich als Front-Bande nicht getrennt. Die Übereinstimmung der Fraktionen C 14 und C 15 bei C. thummi thummi (●) ist größer mit den Banden von G. barbipes als mit den Fraktionen von C. pallidivittatus (◊) (vgl. auch mit den Abb. 8, 9 und 10). Ausnahmsweise tritt eine sehr feine Bande auch bei C. pallidivittatus in derselben Stelle der Fraktion C 15 auf (). Im Bereich D 6 - D 7 sind die bereits in Abb. 10 angesprochenen Mobilitätsunterschiede (schneller ←, langsamer →) bei G. barbipes und C. pallidivittatus zu D 7 von C. thummi thummi angegeben.

3.2.2. Elektrophoretische Analyse der Kernproteine von Glyptotendipes barbipes (Chironomidae)

Zunächst war interessant, die oben beschriebenen Auftrennungen der Kernproteine von C. thummi thummi, C. thummi piger und C. pallidivittatus mit solchen der Kernproteine der Chironomide Glyptotendipes barbipes zu vergleichen. In Abb. 14 ist die vergleichende Analyse der Kernproteine von C. thummi thummi aus einer süddeutschen Freilandpopulation und G. barbipes wiedergegeben. Bei G. barbipes waren 71 Fraktionen identifizierbar. Auffällig ist die große Übereinstimmung zahlreicher Fraktionen (ca. 75%), besonders in den prominenten Banden. Unterschiede wurden nur in feineren Banden deutlich. Die Nomenklatur der Glyptotendipes-Kernproteine entspricht der für C. thummi thummi (Abb. 12). Im einzelnen zeigten die bereits oben genannten Bereiche folgendes Ergebnis:

F₈ ist bei G. barbipes in entsprechender Menge vorhanden wie bei C. thummi thummi (Abb. 10 und 14).

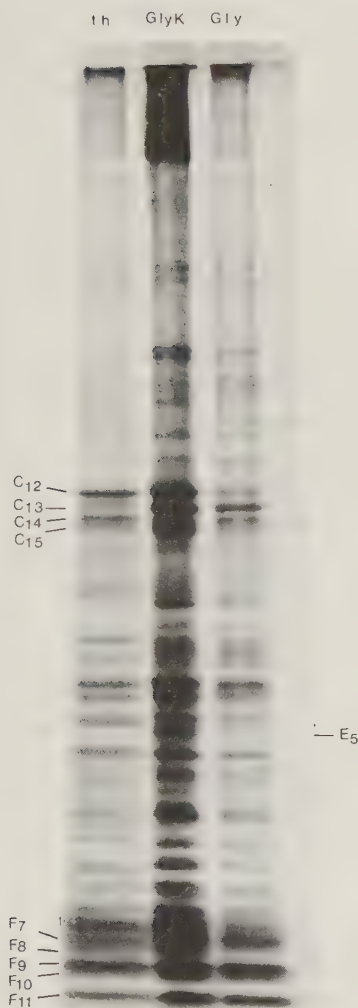


Abb. 14:

Vergleichende elektrophoretische Analyse der Speicheldrüsen Kernproteine im linearen Gradienten Gel (10 - 17.5%) von links nach rechts. C. thummi thummi, Süddeutsche Population (th), G. barbipes nach Kältebehandlung (GlyK) und G. barbipes Kontrolle (Gly). Die Tetrade C 12, C 13, C 14 und C 15 bei (th) läuft exakt parallel mit der Kontrolle (Gly). Die Tetrade ist auch in GlyK sichtbar, und C 15 ist stärker ausgeprägt. E 5 ist bei GlyK neu.

Im Bereich $D_6 - D_7$ ist keine exakte Parallelität zu C. thummi thummi D_7 feststellbar. Im gleichen Bereich ist jedoch bei G. barbipes eine deutliche zusätzliche Fraktion mit leicht erhöhter elektrophoretischer Mobilität als D_7 aufgetrennt (Abb. 10 und Abb. 14).

Im Gradienten Gel (10 - 17.5%) Acrylamid) wurden normalerweise bei G. barbipes im Bereich der Tetrade $C_{12} - C_{13} - C_{14} - C_{15}$ ebenfalls 4 Fraktionen gefunden, deren Mobilitäten jenen bei C. thummi thummi entsprachen (Abb. 14). Dagegen wurde in einer elektrophoretischen Auftrennung mit den gleichen Bedingungen anstelle dieser Tetrade ein Muster von 3 Zonen erhalten, das sich recht deutlich vom C. thummi thummi Muster unterscheidet.

Nach langer Kältebehandlung (5 Wochen) und anschließender Erwärmung (2 h, 18°C) werden im Centromer der Chromosomen bei Glyptotendipes-Speicheldrüsen die Heterochromatintrommeln verändert (Walter, 1973). Dabei folgt nach einer Übergangsphase von periphär gebänderter zentral aufgelockerter Heterochromatin-Struktur eine sogenannte Pseudo-puff-Struktur. Zunächst bildet sich eine zentrale Auflockerung der Centromer-Heterochromatin-Querscheiben. Letztere erscheinen etwas stabiler als die zentrale Querscheibe der Centromer-Region. Während dieses Pseudo-puffings ist eine Akkumulierung von Puff-spezifischen Proteinen zu beobachten (Schmidt, 1980).

Die Analyse der Proteine der in der beschriebenen Weise mit Kälte behandelten Tiere ergab charakteristische Unterschiede gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren.

Die Fraktion F_8 zeigte eine kälteabhängige Intensitätszunahme (Abb. 10, 14).

Eine nur nach Kältebehandlung erkennbare neue Bande im Bereich um 29.000 D (E_5) war feststellbar.

In der schon mehrfach angesprochenen Tetrade $C_{12}-C_{15}$ war bei G. barbipes nach Kältebehandlung eine erhebliche Intensitätssteigerung der Fraktion C_{15} auffällig. Dies verdeutlicht Abb. 15 im Densitogramm.

Diese nach Kältebehandlung beobachtete Intensitätszunahme der Fraktion C_{15} bei G. barbipes wird dadurch besonders interessant, daß einerseits gleichzeitig eine Auflockerung des großen heterochromatischen Centromers erfolgt (Schmidt, 1980) und andererseits durch die Tatsache, daß diese Fraktion eine hohe spezifische Bindungsaffinität zu AT-reichen heterochromatischen DNA-Sequenzen von C. thummi thummi zeigt (vgl. 3.2.3).

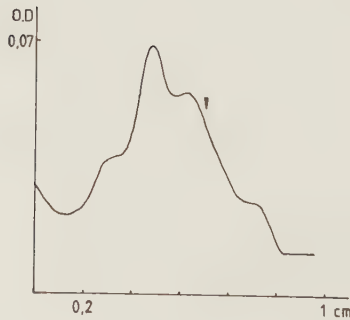
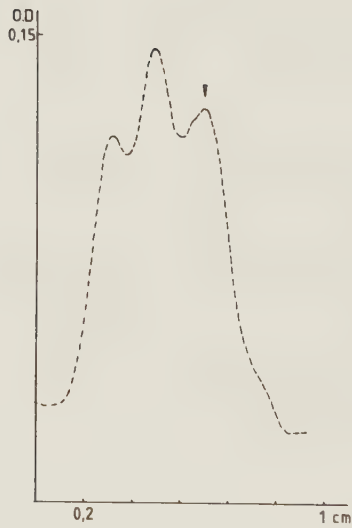


Abb. 15:

Densitogramm der Tetrade C 12, C 13, C 14 und C 15 der Gly (—) und GlyK (---) der Abb. 14. Der Pfeil (➡) zeigt den quantitativen Unterschied der schnelleren Fraktion der Tetrade.

3.2.3. Präferentielle Bindung von Chironomus-Kernproteinen an eine DNA-Fraktion aus C. thummi thummi

Satelliten-DNA konnte durch Zentrifugation in CsCl-Dichtegradienten bei C. thummi thummi nicht nachgewiesen werden (Wobus, 1975; Steinemann, 1978). Erst durch differentielle thermische Denaturierung der Gesamt-DNA gelang die Isolierung einer AT-reichen DNA-Fraktion (Schmidt et al., 1980). In situ hybridisiert diese DNA-Fraktion in den Speicheldrüsenchromosomen des C. thummi-Bastards an die Kinetochorenregion und außerdem an jene Querscheiben von C. thummi thummi, deren DNA-Gehalt gegenüber den homologen Chromomeren von C. thummi piger verdoppelt ist (Keyl 1965a, Schmidt et al., 1980). Die betreffende DNA-Fraktion enthält 80% AT-Basen Paare; die Gesamt-DNA 67% A-T; etwa 30% dieser Fraktion reassoziieren bei $cot < 1$ und repräsentieren ca. 2.5 - 3% des gesamten Genoms von C. thummi thummi. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde aus dem Genom von C. thummi thummi eine repetitive AT-reiche Sequenz von 120 Basenpaaren-Länge mit entsprechendem Hybridisierungsverhalten isoliert (Schmidt, 1981).

Es lag nahe, die Frage zu prüfen, ob die betreffende Fraktion der Chironomus-DNA präferentiell an bestimmte Kernproteine bindet. Bei der unterschiedlichen Verteilung dieser DNA im Genom der beiden C. thummi-Unterarten richtete sich die Aufmerksamkeit dabei vor allem auf solche Kernproteinfraktionen, hinsichtlich derer zwischen C. thummi thummi, C. thummi piger, C. pallidivittatus und G. barbipes Unterschiede bestehen.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. E. Schmidt (Lehrstuhl für Genetik der Ruhr-Universität, Bochum) wurden folgende Experimente mit der von ihm geklonten heterochromatin-spezifischen DNA von 120 Basenpaaren Länge aus C. thummi thummi (Schmidt, 1981; pers. Mitteilung, 1981) durchgeführt.

Zunächst wurden die gesamten aufgetrennten Kernproteine elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Filter (Schleicher und Schüll) übertragen (Towbin et al., 1979). Das SDS aus den Protein-SDS-Komplexen wurde direkt auf den Nitrozellulose-Filtern nach Weber und Kufer (1971) entfernt. Anschließend wurden klonierte ^{32}P -DNA-"120 N.P.repeats" (Schmidt, 1981) mit den SDS-freien Proteinfractionen auf den Filtern inkubiert.

Die Bindung der AT-reichen ^{32}P -"-120-B.P.repeats"-DNA an die aufgetrennten Kernproteinfraktionen von C. thummi thummi, C. thummi piger, C. pallidivittatus und G. barbipes wurde sowohl in Gegenwart als auch ohne Zugabe von überschüssiger unmarkierter "Kompetitor-DNA" aus Kalbsthymus geprüft. Entsprechend zu den DNA-Proteinbindungsversuchen in situ an Riesenchromosomen (Schmidt und Keyl, 1981) wurden die Filter mit 2M NaCl gewaschen. Autoradiographie der Nitrozellulosefilter erlaubte die Lokalisierung proteingebundener "120 N.P.repeats"-DNA.

Wie die Autoradiogramme (Abb. 16) zeigten, bindet die betreffende DNA-Fraktion an eine beschränkte Anzahl von Kernproteinfraktionen aus C. thummi thummi, C. thummi piger und C. pallidivittatus, auch nach Zugabe von nicht markierter Kalbsthymus-DNA im Überschuß (Abb. 16, B). Die Lage dieser Fraktionen stimmt in der Mehrzahl der Fälle bei den drei untersuchten Chironomusarten überein. Im einzelnen erlauben die Autoradiogramme folgende Schlussfolgerungen.

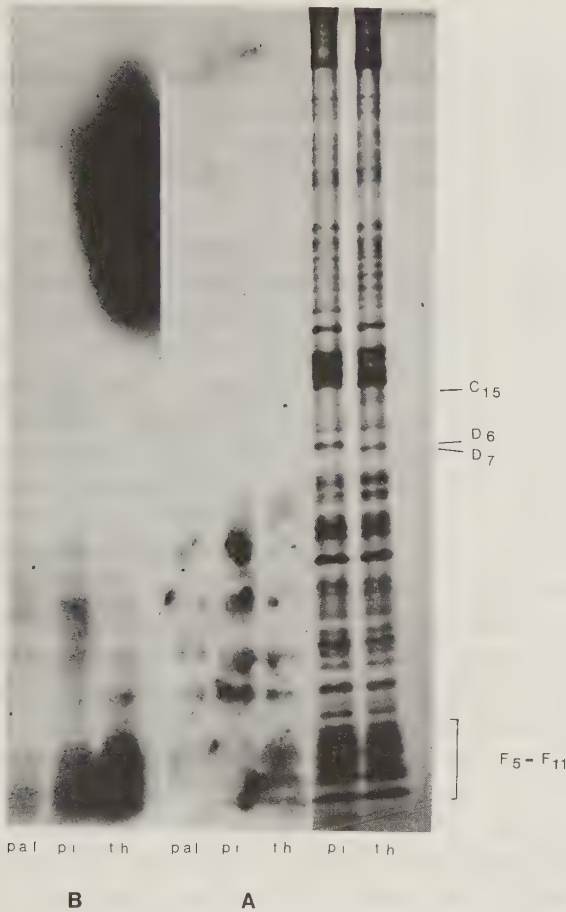


Abb. 16:

Vergleich der Elektropherogramme der gesamten Kernprotein-Frak-tionen aus verschiedenen Chironomiden-Arten mit den Autoradiogrammen der identifizierbaren Protein-Frak-tionen, an die die Heterochromatin AT-reiche DNA bindet. Die da-bei entstandenen Autoradiogramme sind zusammen mit iden-tischen, gefärbten Gelen abgebildet, um die spezifischen DNA-bindenden Protein-Frak-tionen zu vergleichen. Die mit (A) bezeichnete Autoradiogramm-Gruppe der Laufstrecken (pal-pi-th) zeigt die nach Inkubation ohne "Kompetitor DNA" (d.h. ohne Kalbs-Thymus DNA im Überschuß) iden-tifizierbaren erhaltenen DNA-Protein-Bindungen. Die mit (B) bezeichnete Laufstrecken-Gruppe (pal-pi-th) ist das Auto-radiogramm nach Inkubation mit "Kompetitor DNA" (d.h. mit Kalbs-Thymus DNA im Überschuß). In beiden Fällen (A und B) wurde mit hoher Salz-Molarität (2M NaCl) gewaschen und an-schließend 6 Tage exponiert.

Im Bereich der Gruppe $F_5 - F_{11}$ (Nukleosomen-Histone) bindet die AT-reiche DNA ebenso wie in fünf Zonen in den Bereichen $E_3 - E_4$, $E_4 - E_5$, E_6 , E_{11} und F_1 bei allen untersuchten Chironomusarten.

Im Bereich $D_{10} - E_1$ war bei C. thummi thummi und C. thummi piger, weniger stark auch bei C. pallidivittatus, eine Bindung zu erkennen, die unter Kompetitionsbedingungen völlig verschwand (Abb. 16, B).

Im Bereich $D_6 - D_7$ wurde nur bei C. thummi piger eine DNA-Bindung erhalten, die ebenfalls bei Kompetition mit überschüssiger Kalbsthymus-DNA nicht erkennbar blieb.

Besonders interessant ist die spezifische Bindung der betreffenden DNA-Fraktion im Bereich der Proteinzone C_{15} bei C. thummi thummi und C. thummi piger, die im Elektropherogramm von C. pallidivittatus keine Entsprechung findet. Bei dieser Art zeigt das Autoradiogramm dagegen die Bindung der DNA in einer etwas schnelleren Zone, der keine im gefärbten Gel erkennbare Fraktion entspricht.

Bei Glyptotendipes barbipes sind nach CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation zwei Satelliten isoliert worden (Schmidt, 1980). Sat. I (8% der Gesamt-DNA) ist AT-reich (etwa 87% AT); Sat. II (7% der Gesamt-DNA) ist relativ AT-ärmer (etwa 80% AT).

Während des Pseudo-Puffings im Centromer der Riesenchromosomen bei G. barbipes, induziert durch Kältebehandlung, sind folgende in situ-Hybridisierungen nachgewiesen worden: Sat. I hybridisierte mit der zentralen Auflockerung, während Sat. II mit den peripheren Heterochromatin-Banden sowie auch schwach mit dem Nucleolus hybridisierte (Schmidt, 1980).

Schmidt (1980) konnte zeigen, daß Sat. II von G. barbipes mit dem Heterochromatin der kinetochornahen Querscheiben und auch in den bestimmten Chromomeren, wo Duplikationen bei C. thummi thummi auftraten (Keyl, 1965a, b) hybridisierte. Damit erscheint eine Homologie des Sat. II von G. barbipes mit der "80°- (th) AT-reichen DNA" von C. thummi thummi wahrscheinlich (Schmidt, 1980). Dieses und die Präsenz einer besonders prominenten Proteinfraction C₁₅ im Elektropherogramm der Kernproteine von G. barbipes (vgl. 3.2.2) war der Anlaß, die Bindung der AT-reichen C. thummi thummi DNA-Fraktion an Glyptotendipes-Kernprotein Elektropherogrammen zu prüfen. Die spezifische Bindung dieser Fraktion konnte bestätigt werden (Schmidt, unveröffentlicht).

3.3. Die Kernproteine der larvalen Speicheldrüsen von Chironomus pallidivittatus nach experimenteller Aktivitätsänderung spezifischer Genorte

Durch Zusatz von Galaktose (0.5%) zur Kulturlösung wird in den Chironomus-Larven eine spezifische Änderung der Aktivität bestimmter Genorte induziert (Beermann, 1973). Der größte der zellspezifischen puffs der Speicheldrüse mit der höchsten Uridin-Einbaurate, der Balbiani-Ring 2, wird unter diesen Bedingungen weitgehend reprimiert; der normalerweise verhältnismäßig kleine Balbiani-Ring 1 erfährt dagegen eine bedeutende Vergrößerung und entsprechende Steigerung der RNA-Syntheserate. Außerdem bilden die Zellen einen neuen Balbiani-Ring (6) im Chromosom III aus Beermann (1973). Diese Aktivitätsveränderungen kommen mit zeitlicher Verzögerung auf der Ebene der Synthese zellspezifischer Proteine zum Ausdruck (Grossbach, 1977), deren Genorte in den betreffenden Chromosomenabschnitten lokalisiert worden sind (Grossbach, 1969).

Es lag nahe, das Muster der Kernproteine der Speicheldrüsen bei so beeinflusster puff-Aktivität zu untersuchen, um durch Vergleich mit Kontrollkernen etwaige Veränderungen zu ermitteln, die möglicherweise mit der Induktion bzw. Repression der Balbiani-Ringe korreliert sind.

Für die Isolierung der Kernproteine nach Galaktose-Behandlung benötigte ich etwa 500 bis 1000 Larven, für die parallel laufende Kontrolle waren ebenfalls etwa 500 Larven des vierten Larvenstadiums notwendig. Das Aussortieren der Larven dauerte einen Tag. Die Tiere blieben während dieser Zeit in Kulturwasser (18°C) mit Futter und neuem Zellstoff. Erst nach Erhalten der erforderlichen Populationsgröße (ca. 1500 Tiere) konnte am nächsten Tag mit der Galaktose-Behandlung begonnen werden. Die Larven wurden ohne Waschvorgang vorsichtig in die Galaktose-Lösung überführt, die Galaktose-Lösung war also nicht futterfrei. Dadurch ergab sich eine deutliche zeitliche Verzögerung der Reaktion der Balbiani-Ringe im Vergleich zu den Angaben von Beermann (1973).

Während der ersten beiden Tage nach Beginn der Galaktose-Behandlung konnte keine Veränderung der Aktivität der Balbiani-Ringe 1 und 2 festgestellt werden; der Lokus des Balbiani-Ringes 6 war weder als puff noch als Balbiani-Ring ausgebildet. Diese Verzögerung ist vermutlich sowohl auf die aufwendige Vorbereitung für die benötigte Populationsgröße wie auch auf die Präsenz von Futter während der ersten beiden Tage zurückzuführen.

Erst am dritten Tag konnte in etwa 30% der untersuchten Chromosomen IV nach der Klassifizierung der Balbiani-Ring Größe bei den Balbiani-Ringen 2 eine Verkleinerung (+) festgestellt werden. Die restlichen etwa 70% der Balbiani-Ringe 2 waren noch normal (++) ausgebildet. Die Größe der Balbiani-Ringe 1 variierte sehr stark. In etwa 20% der Chromosomen konnte eine deutliche Vergrößerung festgestellt

werden. Es waren aber auch zu diesem Zeitpunkt sowohl unveränderte (+) wie auch gegenüber dem Normalzustand verkleinerte Balbiani-Ringe 1 aufgetreten. Zu diesem Zeitpunkt (3. Tag) war im Locus des Balbiani-Rings 6 weder ein puff noch ein Balbiani-Ring erkennbar.

Unterschiede im Muster der Kernproteine gegenüber den Kontrolltieren konnten am 3. Tag nach Beginn der Galaktose-Behandlung in drei unabhängigen Experimenten nicht entdeckt werden.

Am 5. Tag nach Beginn der Galaktose-Behandlung zeigten etwa 65% der untersuchten Chromosomen IV eine deutliche Vergrößerung der Balbiani-Ringe 1 bzw. Verkleinerung der Balbiani-Ringe 2. Am Locus von Balbiani-Ring 6 war nach wie vor weder ein puff noch ein Balbiani-Ring entwickelt.

Erst am 6. Tag konnte im Chromosom III an der betreffenden Stelle ein Beginn der puff-Bildung beobachtet werden. Während der Tage 8-12 nahm in diesem Bereich das puffing immer stärker zu, so daß schließlich ca. 20% als volle Balbiani-Ringe 6, etwa 50% als große puffs ausgebildet waren. In dieser Zeitspanne waren die Balbiani-Ringe 2 zu etwa 20-30% teilweise (+) und zu etwa 40% völlig (-) reprimiert. Die restlichen Balbiani-Ringe 2 mit der Klassifizierung (+) waren deutlich kleiner als bei den Chromosomen der Kontrolltiere. Gleichzeitig waren etwa 70% der Balbiani-Ringe 1 deutlich vergrößert (++). Nach 12 Tagen Galaktose-Behandlung zeigten die Tiere einen geschwächten Allgemeinzustand, der sich z.B. in einer drastisch reduzierten Bewegungsaktivität äußerte. Daher konnte die Wirkung der Galaktose-Behandlung nicht über einen längeren Zeitraum als 12 Tage untersucht werden, weil für die anschließende Massenisolierung der Kerne die Anzahl der überlebenden Tiere nicht mehr ausreichte.

In den Abb. 17 bis 19 ist das cytologische Bild der Balbiani-Ringe 1-3 und 6 während des Verlaufs der Experimente wiedergegeben.



Abb. 17:

Veränderung der BR-Größe im Chromosom IV im Verlauf der Galaktose-Behandlung bei C. pallidivittatus.

- a. Kontrolle BR 2 (++) > BR 1 (±)
- b. 3 Tage Galaktose-Behandlung BR 2 (+) $\approx$ BR 1 (+)
- c. 5 Tage Galaktose-Behandlung BR 2 (+) < BR 1 (++),
BR 3 bleibt während der Galaktose-Behandlung unverändert (Maßstab 10 μ m).

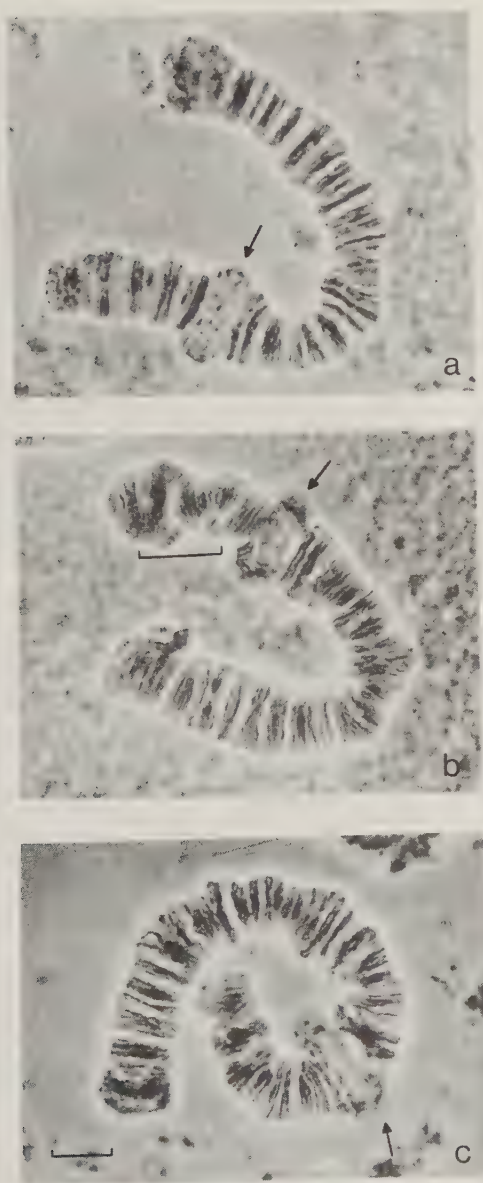


Abb. 18:

Chromosom III bei *C. pallidivittatus* a, b und c. Verschiedene Formen des "puffing" im Bereich des BR 6 (→), jeweils am 8. Tag der Galaktosebehandlung. Die Linie in B zeigt eine Inversion (Maßstab 10 µm).

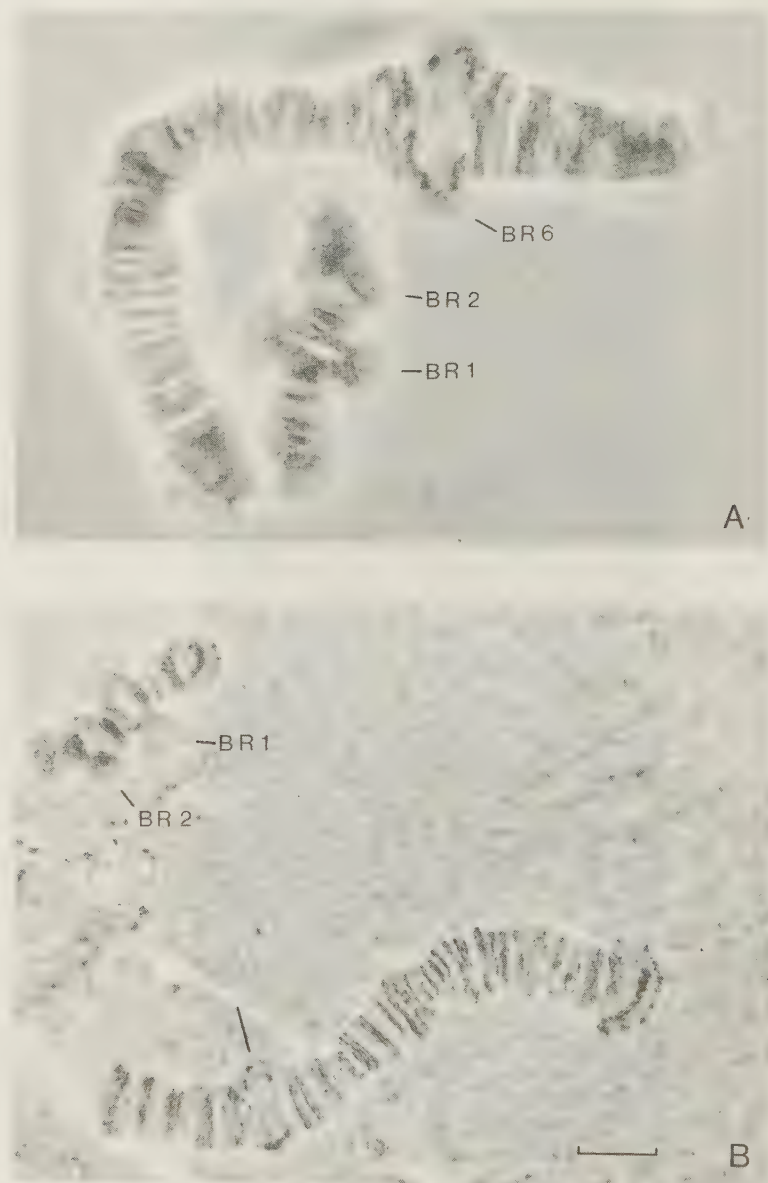


Abb. 19:

8 Tage Galaktose-Behandlung. Variation bei BR 6 in Chromosom III als Balbiani-Ring in A und als puff in B, obwohl BR 1 (++) > BR 2 (+) in den beiden Fällen A und B gleiche Reaktion zeigen (Mästab 10 μ m).

Nach voller Ausbildung der beschriebenen cytologischen Manifestationen der veränderten genetischen Aktivitäten in den Loci der Balbiani-Ringe 1, 2 und 6 wurden die Speicheldrüsenkerne von jeweils 500 - 1000 Larven isoliert und ihre Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

In vier unabhängigen Experimenten wurden die Tiere insgesamt 5 bzw. 8 Tage mit Galaktose behandelt. Das Muster der Kernproteine stimmte weitgehend mit dem der Kontrollkerne überein, sowohl bei Auftrennung in Gradientengelen mit 5-20% Acrylamid-Gehalt (Abb. 20) als auch in 10%igen Acrylamidgelen (Abb. 22). Als auffällige Unterschiede wurden in den eindimensionalen Elektropherogrammen zwei neue Fraktionen beobachtet (Abb. 20, 22):

a) Eine neue relativ starke Proteinzone trat im Molekulargewichtsbereich von ca. 180.000 D auf. Im Densitogramm (Abb. 21) wird deutlich, daß die neue Fraktion nicht mit der einen schwächeren Fraktion der Kontrolle (185.000 D) parallel läuft. Die Reduktion der Fraktion 180.000 D im Laemmli-Probe-Puffer mit 5 bzw. 10% β -Mercaptoäthanol ergab keine quantitative Herabsetzung dieser Zone und keine neuen, kleineren Untereinheiten (Abb. 20).

b) Im Elektropherogramm wurde im Molekulargewichtsbereich um 29.000 D eine weitere neue Kernproteinfraktion erhalten (Abb. 20, 22, 23).

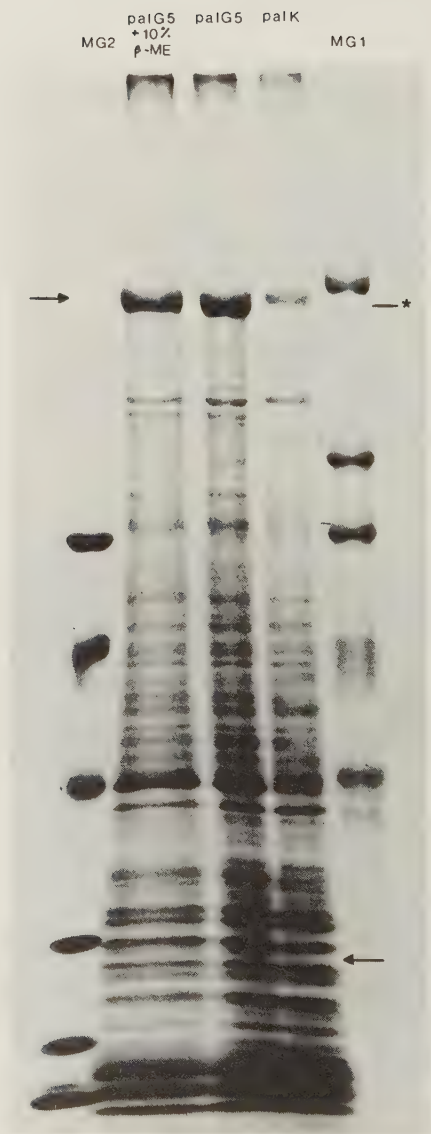


Abb. 20

Abb. 20:

Von rechts nach links: MG 1. Molekulargewichts Protein-Standards (Bio-Rad) Myosin (194.000 D), β -Galaktosidase (116.250 D), Phosphorylase B (92.500 D), Rinderserum Albumin (66.200) und Ovalbumin (45.000 D).

pal K:

Kontrollversuch der 5-tägigen Galaktose-Behandlung. Die Fraktion * (ca. 185.000 D) läuft nicht exakt parallel mit der Galaktose-Fraktion (ca. 180.000 D) bei pal G5 und pal G5 + 10% β -ME, wobei pal G5 die nicht reduzierten Kernproteine nach 5 Tagen Galaktose-Behandlung (ohne β -ME) darstellen; die beiden zusätzlichen Fraktionen, ca. 180.000 D und 29.000 D sind durch Pfeile ($\rightarrow$) gekennzeichnet.

pal G5 + 10% β -Mercaptoäthanol:

Kernproteine aus drei unabhängigen Experimenten nach 5 Tagen Galaktose-Behandlung mit gleichem Auftreten der Galaktose-spezifischen Fraktionen sind zusammengepoolt, reduziert mit 10% β -Mercaptoäthanol; 5 min gekocht und parallel aufgetragen. Die Fraktion 180.000 D bleibt unreduziert. Beide Fraktionen sind noch zu sehen ($\rightarrow$). MG 2 Molekulargewichts Protein-Standards (Bio-Rad) wie in Abb. 8, linearer Gradient 5 - 20%, Sammelgel 5 %.

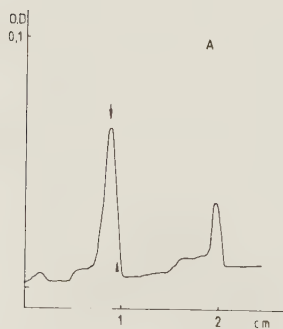
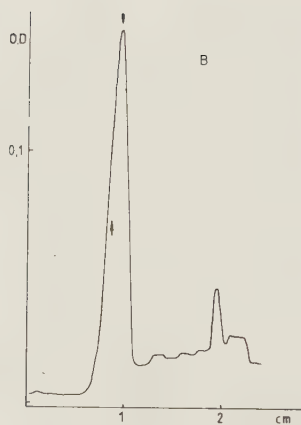


Abb. 21:

Densitogramme im Molekulargewichtsbereich $13-20 \times 10^5$ D der Laufstrecken der Abb. 20 pal K (A) und pal G5 (B). Die beiden Pfeile in den Densitogrammen unterscheiden die Stellen der Fraktionen bei 185.000 D und 180.000 D.

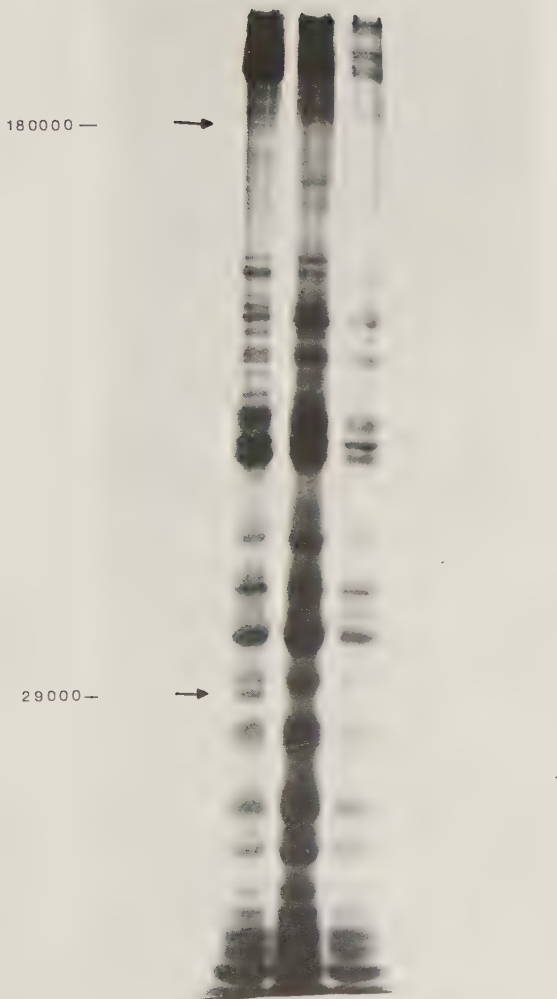


Abb. 22:

- a. Kernproteine am 8. Tag der Galaktose-Behandlung. Die beiden Fraktionen 180.000 D und 29.000 D sind mit Pfeilen gekennzeichnet (→).
- b. Kontrolle des Experiments.
- c. Kernproteine isoliert nach Kältebehandlung (Stockert und Diez, 1979). Die Galaktosefraktionen fehlen; 10% Trenngel, 5% Sammelgel.

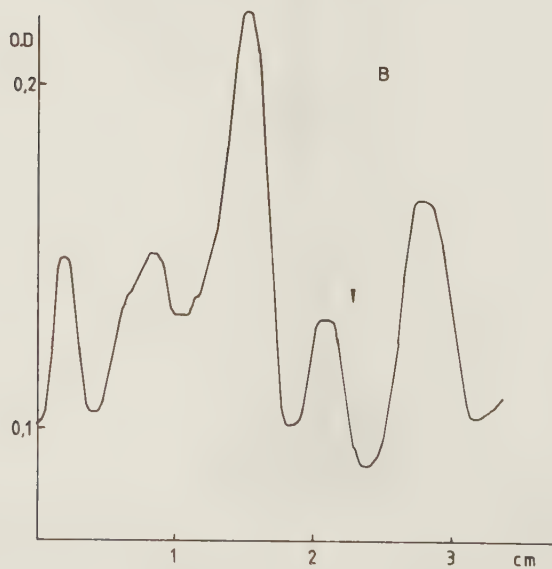
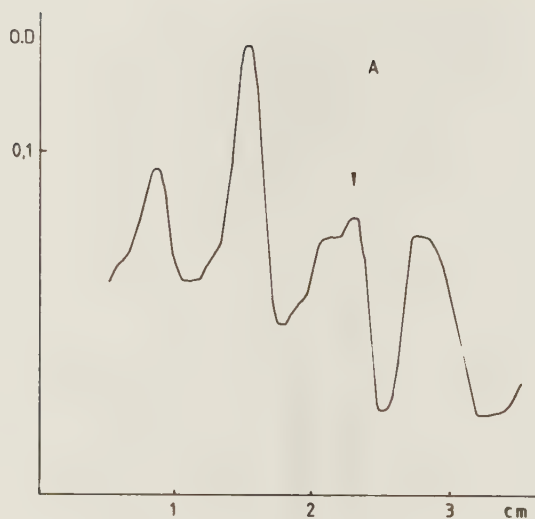


Abb. 23

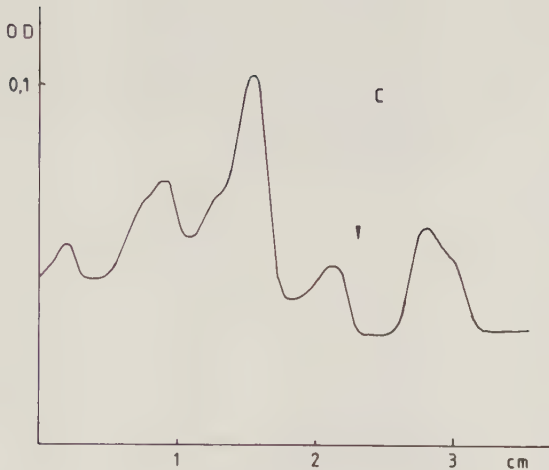


Abb. 23:

Densitometrische Darstellung innerhalb des Ausschnitts der Abb. 22. A, B und C. Densitogramme der Laufstrecken a, b und c. Der Pfeil (→) zeigt die Stelle der Fraktion 29.000 D.

Während der Galaktose-Behandlung wurden jeweils am zehnten und am zwölften Tag je drei unabhängige Experimente durchgeführt. In allen elektrophoretischen Auftrennungen konnten die beiden Proteinzonen in den erwähnten Molekulargewichtsbereichen ebenfalls beobachtet werden. Die Abb. 24 und 25 zeigen die beiden Fraktionen am zehnten Tag der Galaktose-Behandlung in Photographie und Densitogramm. Besonders deutlich war in den Experimenten am fünften, achten und zehnten Tag die exakte quantitative und qualitative Übereinstimmung aller Fraktionen, außer den beiden angesprochenen Unterschieden. Dies spricht für die reale Natur der

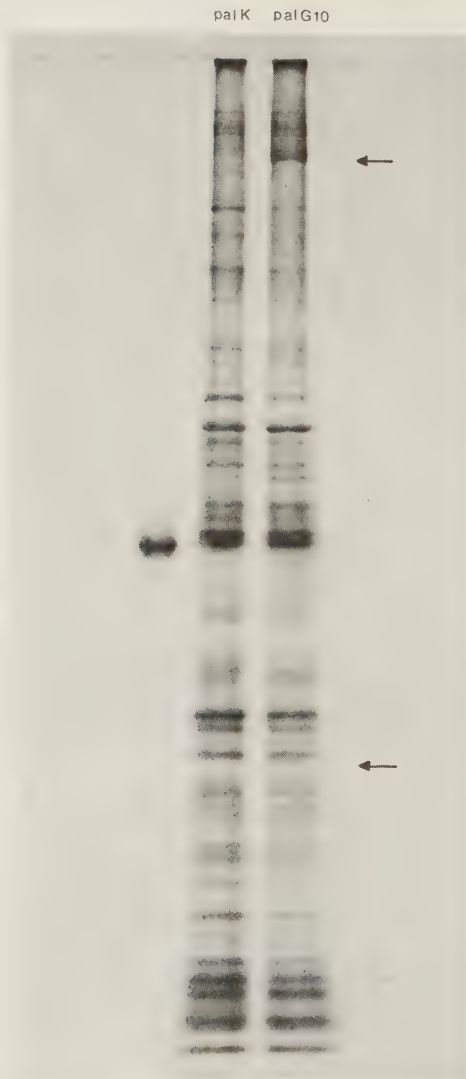


Abb. 24:

pal K. Kontrolle

pal G10. Kernproteine am 10. Tag der Galaktose-Behandlung.
Die beiden Fraktionen 180.000 D und 29.000 D sind durch
Pfeile (→) gekennzeichnet.

Lineares Gradienten-Gel: 10 - 17.5%, Sammelgel: 5%.

Unterschiede und gegen eine Interpretation als Artefakte. In den 10 - 17.5%igen Gelen war die Fraktion 180.000 D allerdings quantitativ herabgesetzt (Abb. 24 und 25). Dies ist wahrscheinlich durch die geringere Porengröße der Gele bedingt, aber auch Protein-Protein Interaktionen können nicht ausgeschlossen werden.

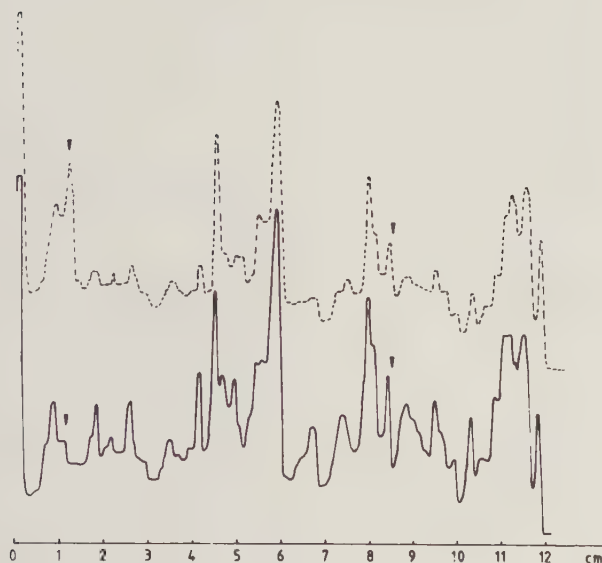


Abb. 25:

Densitogramme der Laufstrecken pal K (—) und pal G10 (---) (vgl. Abb. 24). Die Stellen der beiden Fraktionen 180.000 D und 29.000 D sind mit Pfeilen (↗) gekennzeichnet. Laufrichtung von links nach rechts.

In drei unabhängigen Experimenten wurden die Kernproteine nach 12-tägiger Galaktose-Behandlung untersucht, wo die Tiere relativ geschwächt sind (Abb. 26 bis 29). Hier fielen außer den oben angesprochenen beiden Fraktionsunterschieden noch andere feinere quantitative Intensitäts-Veränderungen entlang der gesamten Laufstrecke auf. Die beiden Zonen bei 180.000 D und 29.000 D blieben aber noch immer erkennbar. Zwar trat in den untersuchten Populationen von C. pallidivittatus generell im Bereich der Fraktion 29.000 D eine Proteinzone auf, möglicherweise als Ausdruck eines Polymorphismus (vgl. Abb. 10). Das Densitogramm der Abb. 27 läßt allerdings erkennen, daß die Galaktose-behandelten Tiere eine stärkere Intensität der Fraktion zeigten als die benutzten Kontrolltiere. In einem breiteren Gel Gradienten (3-20%) trat die Fraktion 180.000D besonders deutlich hervor, wohingegen die kleine Proteinfraktion wegen der Kürze der Laufstrecke nicht aufgelöst wurde. Außerdem fehlten bei dieser Auftrennung größere Moleküle als 180.000 D, insbesondere bei den Galaktose-behandelten Tieren (Abb. 28 und 29).

Während der Galaktose-Behandlung wurden außer Größenveränderungen der Balbiani-Ringe gleichzeitig häufiger "Nebennukleolen" in den Speicheldrüsenkernen beobachtet. Diese "Nebennukleolen" sind auch präferentiell an Balbiani-Ring 2 assoziiert (Stockert und Diez, 1979). Diese "Nebennukleolen", die durch Galaktose induziert werden können, sind auch nach Kältebehandlung (Beermann, 1952, 1956, 1966; Pelling, 1964; Gaudecker, 1967; Stockert und Diez, 1979) und nach 6 Stunden Erholungszeit nach dem Hitzeschock (Yamamoto, 1970; Stockert und Diez, 1979) in entsprechender Häufigkeit beschrieben worden. Da nach Galaktose-Behandlung das Kernproteinmuster im Bereich von 180.000 D und 29.000 D spezifische Unterschiede aufwies, war es interessant zu erfahren, ob nach Kältebehandlung und Hitzeschock die betreffenden Proteinfractionen ebenfalls auftraten, d.h., es sollte geprüft werden, ob die höhere Anzahl der "Nebennukleolen" mit dem Auftreten dieser Proteinfractionen korreliert werden konnte.

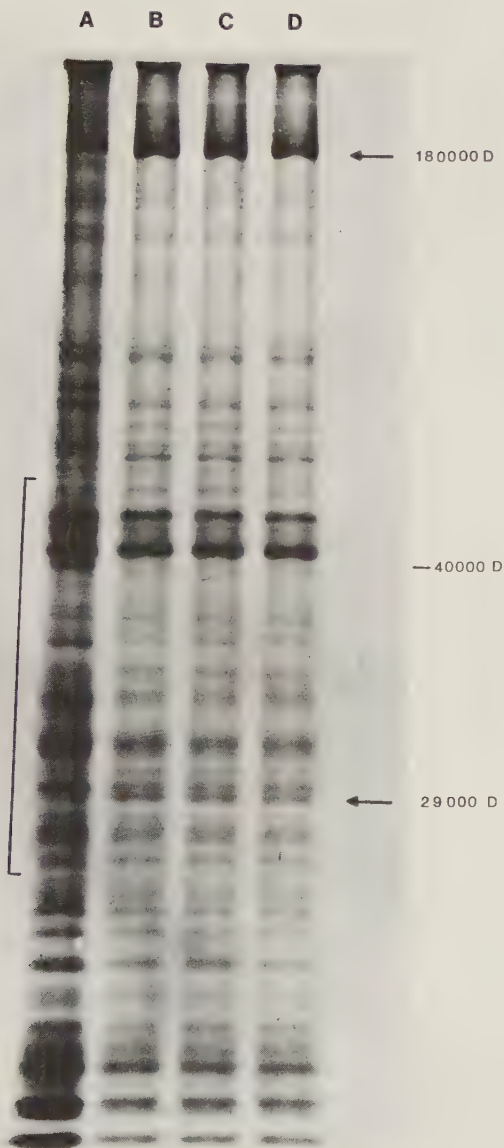
Abb. 26:

Kernproteine am 12. Tag
der Galaktose-Behand-
lung.

A Kontrolle

B, C und D 3 unab-
hängige Experimente
zu diesem Zeitpunkt.
Die Galaktose-spezi-
fischen Fraktionen
sind mit Pfeilen (→)
gekennzeichnet. Die
Fraktion 29.000 D ist
deutlich stärker als
in der Kontrolle (vgl.
Densitogramm Abb. 27).
Unter den feinen quan-
titativen Unterschie-
den ist derjenige um
40.000 D besonders
deutlich.

Lineares Gradienten-
Trenngel: 10 - 17.5%,
Sammelpgel: 5 %.



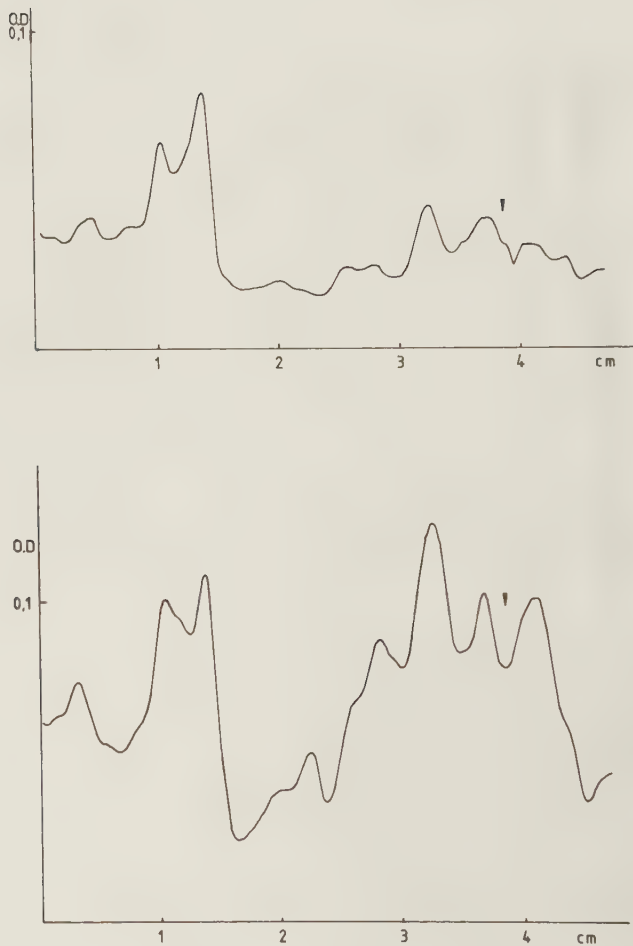
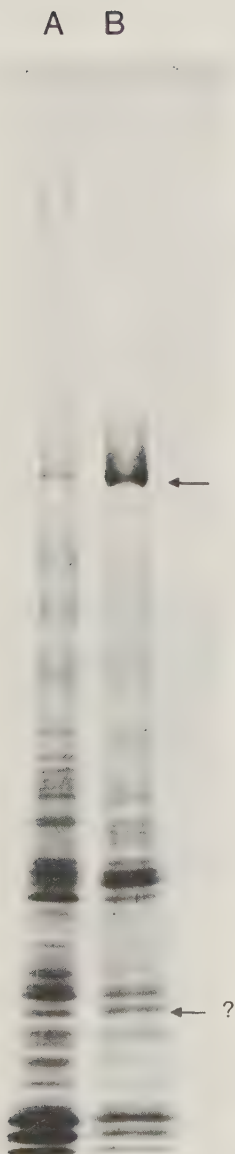


Abb. 27:

Densitometrische Darstellung der Laufstrecken A (unten) und B (oben) der Abb. 26 im Bereich der Linie (—→). Mit Pfeil (→) ist die Stelle der Fraktion 29.000 D gekennzeichnet.

Abb. 28:



Dieselben Proben A und B der Abb. 26 in einem linearen Gradienten-Trenngel 3 - 20%, Sammelgel 3 % aufgetrennt. Der Pfeil ($\rightarrow$) zeigt die Stelle der Fraktion 180.000 D und der Pfeil ($\rightarrow?$) zeigt die vermutliche Stelle der Fraktion 29.000 D, die offensichtlich wegen der Überdeckung durch andere Fraktionen nicht mehr erkennbar ist.

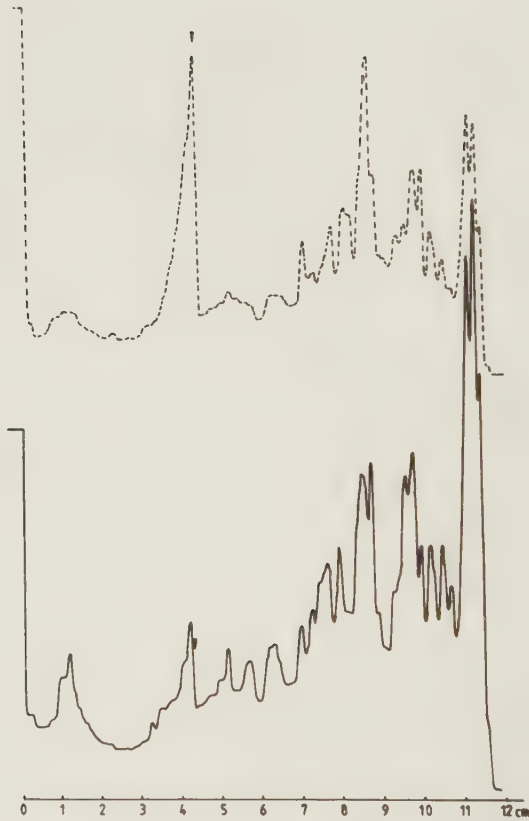


Abb. 29:

Densitometrische Darstellung der Laufstrecken A (—) und B (---) der Abb. 28. Der Pfeil (→) zeigt die Stelle der Fraktion 180.000 D.

Aus den Abb. 22 und 23 geht hervor, daß nach Kältebehandlung das Kernproteinmuster unbeeinflusst bleibt, d.h. Unterschiede gegenüber den Kernproteinmustern der Kontrolltiere wurden nicht gefunden.

Das gleiche Ergebnis wurde auch bei verschiedenen Erholungszeiten nach Hitzeschock (90 min, 3, 6 h) erhalten. Auch hier konnten die beiden Fraktionen 180.000 D und 29.000 D nicht nachgewiesen werden (Abb. 30). Vorläufige Ergebnisse weisen darauf hin, daß während der Erholungszeit nach Hitzeschock, wenn die durch den Hitzeschock reprimierten Balbiani-Ringe neu aktiviert werden (Yamamoto, 1970), anscheinend eine deutliche quantitative Zunahme der Fraktion um 55.000 D (Pfeil) erfolgt.

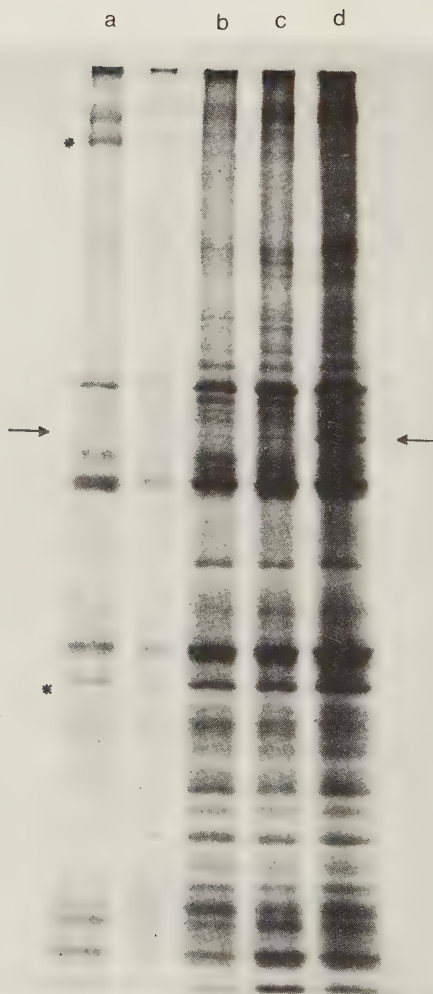


Abb. 30:

Mit der gleichen Population der Larven des IV. Larvenstadiums, mit der das Experiment nach 10-tägiger Galaktose-Behandlung durchgeführt wurde (vgl. Abb. 24), wurde das Hitzeschock-Experiment durchgeführt.

a. Kernprotein-Probe wie in Abb. 24, pal G10. Die Galaktose-Fractionen sind (*) gekennzeichnet.

b, c und d. Kernprotein-Proben nach 1 1/2 h (b), 3 h (c) und 6 h (d) Erholung nach dem Hitzeschock.

Mit Pfeil (→) ist der quantitative Unterschied der Fraktion 55.000 D nach 6 h Erholung gekennzeichnet. Die Galaktose-Fractionen (*) sind nicht nach 6 h Erholung erschienen.

4. Diskussion

Die beschriebene Methode zur Massenisolierung von polytänen Speicheldrüsenkernen aus Chironomus-Larven ermöglicht einem Experimentator die Gewinnung der Kerne von 1000 Tieren pro Tag (mit einer Ausbeute von ca. 40%). Wie die mikroskopische Kontrolle zeigte, waren die Kerne nur in sehr geringem Umfang durch andere Partikel verunreinigt. Wegen der erforderlichen vorausgegangenen Reinigungsschritte kann eine Verunreinigung der Proben durch cytoplasmatische, in der Suspensionslösung gelöste Proteine, ebenfalls nur von geringer Bedeutung sein. Nicht ausgeschlossen werden kann eine Bindung von Proteinen cytoplasmatischen oder anderen Ursprungs an die Kernhülle während des Isolierungsprozesses; über das Ausmaß einer eventuell hieraus resultierenden Verunreinigung kann naturgemäß nichts ausgesagt werden. Hin und wieder haften an den Kernen kleinere Cytoplasmabereiche; im allgemeinen sind die isolierten Speicheldrüsenkerne aber, wie das elektronenmikroskopische Bild zeigt, nur noch von der Kernhülle umgeben (Robert, persönl. Mitteilung).

Die Proteine der Zellkerne wurden durch SDS-Elektrophorese in Acrylamidgelen in etwa 75 Fraktionen aufgetrennt. Der Vergleich der Elektrophoresemuster der Kernproteine nahe verwandter Chironomidenarten hat die Aufmerksamkeit auf einige Fraktionen gelenkt, unter ihnen besonders eine Proteinfraktion von nahe 40.000 D, welche in ihrer Quantität dem Heterochromatingehalt der jeweiligen Art korreliert zu sein scheint. Sie gehört überdies zu der kleinen Gruppe von Fraktionen, an welche eine klonierte repetitive, AT-reiche, heterochromatinspezifische DNA aus C. thummi spezifisch bindet.

Nach der experimentellen Veränderung des puff Musters durch Behandlung der Tiere mit Galaktose wurden zwei neue Proteinfraktionen im Muster der Kernproteine erhalten.

Die Fraktionen F_7 und F_{11} wanderten parallel mit den Kalbsthymus-Histonen H3 und H4 (Abb. 9, vergl. auch Westermann, 1981). Die Drosophila-Histone H3 und H4 zeigten ebenfalls identische Laufstrecken wie Kalbsthymus H3 und H4 (Rodriguez Alfageme et al., 1974). Da eine Bande in der eindimensionalen Auftrennung möglicherweise aus mehreren Proteinen bestehen kann, kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß in den Banden F_7 und F_{11} außer H3 und H4 noch andere Proteine vorhanden sind. Der Vergleich in allen untersuchten Chironomus-Arten zeigt, daß die Banden F_7 und F_{11} keine quantitativen Unterschiede aufwiesen.

Die Banden F_9 und F_{10} weisen ebenfalls keine quantitativen Unterschiede bei den verschiedenen Chironomus-Arten auf (vgl. Abb. 4, 8, 10, 14). Beide Fraktionen zeigten in den verwendeten SDS-PAGE-Gradienten von 10 - 17.5% eine etwas höhere Mobilität als die Kalbsthymus-Histone H2B und H2A (Abb. 9). Dies konnte auch für die Drosophila-Histone H2B und H2A gezeigt werden (Rodriguez Alfageme et al., 1974). Die etwas höheren Mobilitäten der Drosophila-Histone H2B und H2A und der Chironomus-Zonen F_9 und F_{10} im Vergleich zu Kalbsthymus H2B und H2A können die Annahme unterstützen, daß die bei allen untersuchten Chironomus-Arten gleich starken Banden F_9 und F_{10} vor allem die Histone H2B und H2A enthalten. Die biochemische Identifizierung bleibt allerdings offen.

Der Vergleich der Kernproteine mit solchen aus Chironomus-Speicheldrüsen zeigte exakte Parallelität der schnellsten Fraktionen (Mähr et al., 1977) aus Drosophila-Zellkulturen (KS Linie).

Die einzige Bande, die offensichtliche quantitative Unterschiede zwischen den untersuchten Chironomus-Arten zeigt, ist F_8 . Die Kerne von C. thummi thummi und Glyptotendipes barbipes wiesen etwa die gleiche Menge auf. Bei C. thummi piger ist die Quantität dieser Fraktion gegenüber C. thummi thummi erhöht (Abb. 4). In C. pallidivittatus Kernen war die Bande F_8 nur schwächer vorhanden (Abb. 8, 10). Interessanterweise ist die Intensität dieser Bande bei G. barbipes nach Kältebehandlung erhöht (Abb. 10 und 14). - Die Proteinzusammensetzung der Bande F_8 ist unbekannt. Wenn die Annahme richtig ist, daß H_3 und H_2B den Fraktionen F_7 und F_9 entsprechen, könnte die Bande F_8 das bei Drosophila unter ähnlichen elektrophoretischen Bedingungen an der gleichen Stelle wandernde Protein D_2 enthalten (Rodriguez Alfageme et al., 1974, Palmer et al., 1980). Sollte sich diese Vermutung, z.B. durch zweidimensionale Elektrophorese, bestätigen, so wäre es interessant, den Gründen für die erwähnte quantitative Variabilität nachzugehen, in Anbetracht des Umstandes, daß es sich bei D_2 wahrscheinlich um ein Nucleosomen-Protein handelt.

Unter den insgesamt nur geringen Differenzen im Kernproteinmuster der Speicheldrüsen der beiden Unterarten C. thummi thummi und C. thummi piger fällt der quantitative Unterschied in der Fraktion C_{15} ins Auge. Die polytänen Kerne von C. thummi thummi aus Laborinzuchten enthielten mehr als die 3-fache Menge dieser Fraktion als die polytänen Kerne von C. thummi piger (Abb. 4 und 8 und Densitogramme 6 und 7). Bei Freilandtieren aus einer norddeutschen Population von C. thummi gehörte C_{15} ebenfalls zu den prominenten Kernproteinfraktionen (Abb. 9), während bei süd-deutschen C. thummi diese Fraktion stets schwächer war (vgl. Abb. 9 und 10). Bei C. pallidivittatus ist keine C_{15} parallel laufende elektrophoretische Fraktion nachweisbar (Abb. 8, 9 und 10). In 10%igen Trenngelen wurde bei maximaler Auflösung an dieser Stelle in einigen Fällen eine Zone erhalten, die jedoch wesentlich schwächer als

die entsprechende Fraktion C_{15} bei C. thummi piger aufgetrennt war (Abb. 13). Bei G. barbipes wurde C_{15} ebenfalls gefunden. Nach Behandlung der Tiere mit Kälte war die Quantität dieser Fraktion gegenüber den Kontrollen stark erhöht, und diese gehörte zu den auffälligsten Proteinbanden im Gel überhaupt.

Die quantitativen Unterschiede hinsichtlich der Fraktion C_{15} entsprechen Unterschieden im Heterochromatisierungsgrad der Speicheldrüsenchromosomen der untersuchten Chironomidenarten.

In den polytären Chromosomen von C. pallidivittatus sind mikroskopisch keine heterochromatischen Querscheiben zu erkennen. Die Dichtegradienten-Zentrifugation der DNA von C. pallidivittatus ergab keine Anzeichen für die Gegenwart einer Satellitenfraktion (Steinemann, 1978). C. thummi und G. barbipes enthalten dagegen heterochromatische Chromosomenbereiche, was sowohl morphologisch (Bauer, 1936; Keyl, 1963; Haegele, 1977a) als auch an der Gegenwart repetitiver Satelliten-DNA-Fraktionen (Schmidt et al., 1980; Schmidt, 1980, 1981) erkennbar wird. Die in situ-Hybridisierung einer infolge ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens isolierbaren repetitiven DNA-Fraktion zeigte bei den Chromosomen von C. thummi piger im wesentlichen eine Beschränkung auf das heterochromatische Centromer (Schmidt et al., 1980). Bei C. thummi thummi dagegen hybridisieren neben dem Centromer auch mehrere weitere Chromomeren mit gegenüber C. thummi piger erhöhtem DNA-Gehalt, die sich nach modifizierter Giemsa-Färbung als heterochromatisch erwiesen (Haegele, 1977a; Schmidt et al., 1980). Eine Beziehung der Proteinfraction C_{15} zum Heterochromatin der Speicheldrüsenchromosomen war erstmals auf Grund der Beobachtung vermutet worden, daß die morphologische Veränderung des riesigen Centromerenheterochromatins bei G. barbipes nach Kältebehandlung von einer quantitativen Zunahme dieser Fraktion begleitet ist. Das Fehlen von C_{15} bei C. pallidivittatus und die Quantitätsunterschiede zwischen den

Insektenstämmen von C. thummi piger und C. thummi thummi hinsichtlich dieser Fraktion würden zu der Annahme passen, daß C_{15} ein für Heterochromatin spezifisches Protein enthält. Es ist allerdings unter diesem Gesichtspunkt nicht ganz einfach zu verstehen, warum diese Fraktion bei G. barbipes mit seinem hohen Heterochromatingehalt gewöhnlich nicht stark hervortritt und erst nach Kältebehandlung und "Auflockerung" des Heterochromatins als prominente Fraktion erhalten wird. Eventuell können erst nach dieser Entfaltung (Keyl, 1963; Walter, 1973) größere Mengen bestimmter Proteine in Lösung gehen.

Die Vorstellung, daß es sich bei C_{15} möglicherweise um ein für Heterochromatin spezifisches Protein handelt, erfährt eine Stütze durch die Bindungsexperimente mit der von Schmidt (Schmidt, 1981) isolierten, klonierten und sequenzierten AT-reichen, repetitiven DNA-Fraktion aus C. thummi thummi, welche in situ vor allem mit den Centromeren und heterochromatischen Chromomeren von C. thummi thummi, C. thummi piger und G. barbipes hybridisiert (Schmidt, 1980). Nach elektrophoretischer Übertragung der Kernprotein-Elektropherogramme auf Nitrozellulosefilter erhielten wir eine spezifische Bindung dieser DNA an eine begrenzte Anzahl elektrophoretischer Fraktionen, unter ihnen die Fraktion C_{15} bei C. thummi thummi und C. thummi piger.

An der entsprechenden Stelle des Elektropherogramms in C. pallidivittatus wurde keine Bindung beobachtet (Abb. 16). Dies bestätigt die Spezifität der Bindung der DNA-Fraktion an das C_{15} der beiden C. thummi-Unterarten. Wenn man annimmt, daß die Effizienz der elektrophoretischen Übertragung, der Anheftung und der Renaturierung im Filter bezüglich der Fraktion C_{15} sowohl bei C. thummi thummi als auch bei C. thummi piger übereinstimmt, könnte man auf Grund der Autoradiogramme vermuten, daß das Protein bei C. thummi piger eine höhere Bindungsaffinität

hat als bei C. thummi thummi. Dies muß allerdings durch quantitative Filterbindungsstudien untersucht werden.

Interessanterweise bindet die AT-reiche klonierte C. thummi-DNA im Elektropherogramm von C. pallidivittatus auch an einen gegenüber der Fraktion C₁₅ bei den beiden C. thummi-Unterarten etwas schnelleren Bereich (Molekulargewicht um 38.000 D, vgl. Abb. 16 und 8). In diesem Molekulargewichtsbereich sind lediglich feine Banden nachgewiesen worden (Abb. 8). Das heißt, daß die bindende Proteinfraction mengenmäßig gegenüber C₁₅ zurücktritt. Interessant ist dabei die größenordnungsmäßig vergleichbare Bindung an das C. pallidivittatus-Protein.

Bei Drosophila melanogaster ist von Hsieh und Brutlag (1979) ein Heterochromatin-spezifisches Protein, das in der hoch symmetrischen Region des 1,688 g/cm³ Satelliten, bestehend aus repetitiven Einheiten von 359 Basenpaaren, bindet, beschrieben worden. Weitere bekannte Heterochromatin-spezifische Proteine sind das phosphorylierte Histon H1 (Blumenfeld et al., 1978, 1980; Billings et al., 1979) von D. virilis, ein 38.000 D großes Protein von D. melanogaster (Will und Bautz, 1979; Saumweber et al., 1980) sowie ein Protein (D₁) von D. melanogaster.

Heterochromatin-spezifische Proteine sind auch bei einem Vertebraten, wie z.B. Cercopithecus aethiops, bekannt. Musich et al. (1977, 1978) beschreiben H1-analoge Nicht-Histone (Molekulargewichtsbereich 24.000 - 43.000 D), die spezifisch im konstitutiven Heterochromatin, und zwar in einer Komponente, die hochrepetitive DNA-Sequenzen enthält, assoziiert sind.

DNA-freie Riesenchromosomen von C. thummi thummi und G. barbipes binden die repetitive, AT-reiche DNA-Fraktion ebenfalls in der Centromerenregion, vermutlich auf Grund der Gegenwart spezifisch bindender Proteine (Schmidt und Keyl, 1981). Sie könnten den bindenden Fraktionen auf den Elektropherogrammen entsprechen.

Die für die Experimente verwendeten repetitiven AT-reichen Sequenzen liegen nach der Vorstellung von Schmidt et al. (1980) in den heterochromatisierten Banden von C. thummi thummi, und zwar "interspaced" mit Komplexen einzelner anderer Sequenzen, analog der allgemeinen Organisation des Genoms in Eukaryonten (Davidson und Britten, 1973).

Bei einzelnen von Keyl beschriebenen heterochromatischen Querscheiben, z.B. b3/11, konnte RNA-Transkription nachgewiesen werden (Keyl, 1965b). Dieses Ergebnis sowie die N-Giemsa-Färbungstechnik (Haegele, 1977b) zeigten ähnliche Eigenschaften sowohl bei heterochromatischen Querscheiben in C. thummi thummi wie auch bei β -Heterochromatin von Drosophila-Riesenchromosomen. α -Heterochromatin fehlt in C. thummi-Unterarten (Haegele, 1977b). β -Heterochromatin im Chromocentrum von Drosophila-Speicheldrüsen-Chromosomen zeigt genetische Aktivität (Lakkotia et al., 1974; Spradling et al., 1975, 1977; Lis et al., 1978). Außerdem sind in Drosophila melanogaster Gene gefunden worden, die als Komplexe einzelner Sequenzen entweder im oder in der Nähe des β -Heterochromatins liegen (Carlson und Brutlag, 1978; Biessmann et al., 1981). Die Befunde über genetische Aktivität im β -Heterochromatin von Drosophila wie auch die Tatsache, daß in C. thummi thummi die heterochromatischen Querscheiben und Centromeren aus β -Heterochromatin bestehen, ermöglichen Vorstellungen von Genaktivität und Regulation in diesen Chromosomenstellen. Die Gen-Regulation im β -Heterochromatin wäre

über Proteine denkbar und ist beispielsweise für das Chromocentrum von D. melanogaster für das Protein D₁ schon diskutiert worden (Rodriguez Alfageme et al., 1980). Außerdem ist Transkription während des Pseudopuffing im Centromer der Riesenchromosomen von G. barbipes nicht ausgeschlossen (Schmidt und Keyl, 1981).

Bei *C. pallidivittatus* wurden nach längerer Behandlung der Larven mit Galaktose, die in der Speicheldrüse eine Repression bzw. Induktion der zellspezifischen Balbiani-Ringe 2 und 1 sowie die Neubildung von Balbiani-Ring 6 zur Folge hat (Beermann, 1973), im Muster der etwa 75 elektrophoretisch trennbaren Kernproteinfraktionen zwei zusätzliche Zonen von etwa 180.000 D und 29.000 D gefunden.

Viele Faktoren können theoretisch zur Variation der Kernprotein-Muster beitragen. Schließlich ist jede Proteinfraktion in den Elektropherogrammen quantitativ gesehen ein statistischer Mittelwert einzelner Werte von ca. 15.000 Kernen, die zum Zeitpunkt der Präparation für die Elektrophorese benutzt worden sind. Diese ca. 15.000 Kerne wurden aus Tieren mit verschiedenem Entwicklungsalter des IV. Larvenstadiums isoliert. Die Größe der Larven ist kein zuverlässiger Parameter zur Definition des Entwicklungsalters (Clever, 1962; Colman und Stockert, 1975)., Das Ausmaß der Übereinstimmung der Speicheldrüsen-Kernproteine zwischen verschiedenen Individuen sowie einzelnen Kernen innerhalb einer Drüse ist unbekannt. Wie die Befunde in Abb. 10 zeigten, ist trotz intensiver Suche keine Variation der Kernproteine zwischen mittlerem und spätem IV. Larvenstadium bei beachtlichen Größenunterschieden der Tiere gefunden worden.

Wie in der Methode schon erwähnt ist, wurde auf die Präparation der Vorpuppen völlig verzichtet. In diesem Stadium ist Balbiani-Ring 1 größer als im mittleren und späten IV. Larvenstadium (Lezzi und Gilbert, 1969; Colman und Stockert, 1975; Pankow et al., 1976; Santa-Cruz et al., 1978). Deshalb wurde streng darauf geachtet, in den Galaktose-Experimenten bei den behandelten und Kontrolltieren keine Vorpuppen einzubeziehen.

Die Reproduzierbarkeit aller Zonen läßt die Annahme zu, daß es sich bei den ca. 75 Fraktionen um prominente Fraktionen der Kernproteine handelt; d.h. die Empfindlichkeit der Methode reichte mit Sicherheit nicht aus, um im Verlauf des IV. Larvenstadiums etwaige quantitative Proteinveränderungen aufzufinden, die z.B. von kleinen puff-Veränderungen herrühren könnten (Clever, 1962).

Die nach Galaktose-Behandlung erhaltenen neuen Protein-Fraktionen sind wahrscheinlich nicht mit dem Auftreten nach Galaktose-Behandlung von Nebennukleolen im Kernsaft und am Balbiani-Ring 2 korrelierbar. Die Induktion entsprechender Nebennukleolen durch Kältebehandlung bzw. Hitzeschock war nämlich nicht von entsprechenden Änderungen des Kernproteinmusters begleitet.

Daß bereits am fünften Tag nach Versuchsbeginn beide Proteinfractionen (180.000 D und 29.000 D) elektrophoretisch nachgewiesen werden konnten, wobei Balbiani-Ring 6 weder als puff noch als Balbiani-Ring sichtbar war, spricht dafür, daß die angesprochenen Proteinfractionen nicht mit diesem, sondern vielleicht mit der Induktion von Balbiani-Ring 1 bzw. mit der Repression von Balbiani-Ring 2 korreliert sind.

Die beiden Proteinfractionen nach der Galaktose-Behandlung werden vielleicht während der ersten Phase des Experiments im Cytoplasma synthetisiert und nur langsam

im Kern akkumuliert, so daß sie schließlich am fünften Tag von der Empfindlichkeit der elektrophoretischen Methode erfaßt werden könnten.

Unter Umständen ist das neue Auftreten der beiden Fraktionen mit der Erhaltung des reprimierten Zustandes in Balbiani-Ring 2 und des aktivierten Zustandes von Balbiani-Ring 1 während der Galaktose-Behandlung für den Zeitraum 5 - 12 Tage korrelierbar, d.h., daß die beiden Protein-Fraktionen bei der Regulation der Balbiani-Ring-Größe eine Rolle spielen könnten. "Repressor-like" Faktoren sind bereits für die Erhaltung der Repression von Balbiani-Ring 2 nach Galaktose-Behandlung in C. thummi postuliert worden (Diez et al., 1980). Eine De-Repression des Balbiani-Rings 2 der Galaktose-behandelten Larven ist durch Protein-Synthese-Hemmer (z.B. Cycloheximd) induzierbar. Damit ist die Rolle von neu synthetisiertem Protein oder Proteinen für die Erhaltung des reprimierten Zustands bei Balbiani-Ring 2 denkbar (Diez et al., 1980). Zur Zeit können über die reale Rolle der beiden Fraktionen keinerlei Aussagen gemacht werden. Mittels der Technik der Transplantation polytärer Chironomus-Kerne in Xenopus-Oocyten (Grossbach und Streichhan, 1981) könnte vielleicht die Rolle der oben genannten Proteinfractionen, die gereinigt injiziert und in der Oocyte auf die transplantierten Kerne einwirken können, geprüft werden.

5. Zusammenfassung

Eine neue Methode zur Massenisolierung von larvalen Speicheldrüsen bei verschiedenen Chironomiden-Arten wird beschrieben; sie ermöglicht eine hohe Ausbeute an intakten Speicheldrüsen, die Voraussetzung für eine reine Zellkern-Fraktion sind. Aus circa 500 Larven konnten routinemäßig 40% der Speicheldrüsen-Kerne rein erhalten werden.

Die hohe Reproduzierbarkeit des elektrophoretischen Musters der Speicheldrüsen-Kernproteine in der eindimensionalen SDS-Acrylamid-Elektrophorese bei allen untersuchten Chironomiden-Arten sowie die Übereinstimmung der etwa 75 elektrophoretisch aufgetrennten Proteinfaktionen im Verlauf des mittleren und späten IV. Larvenstadiums erlaubte die Durchführung vergleichender Analysen zwischen verschiedenen Arten.

Die Speicheldrüsenkerne der untersuchten Arten C. thummi, C. thummi piger, C. pallidivittatus und Glyptotendipes barbipes haben einen unterschiedlichen "Heterochromatin"-Gehalt. Zwischen verschiedenen Stämmen von C. thummi thummi und auch zwischen den beiden Unterarten von C. thummi thummi und C. thummi piger bestehen bei bestimmtem Chromomeren Unterschiede im DNA-Gehalt (Keyl, 1965a, b). Die Kernproteine der Speicheldrüsen beider Unterarten zeigten im eindimensionalen elektrophoretischen Vergleich bei weitgehender Übereinstimmung einzelne charakteristische quantitative und qualitative Unterschiede. Dabei fielen vor allem bei der Fraktion C₁₅ (Molekulargewicht ca. 40.000 D) deutliche quantitative Unterschiede auf. Planimetrische Messungen der Densitogramme der Gele nach Färbung der Proteine mit Coomassie brilliant blue R 250 zeigten ein Verhältnis zwischen C. thummi piger und C. thummi thummi von etwa 1:3. Bei C. pallidivittatus konnte eine

entsprechende Fraktion nicht nachgewiesen werden, bei den besonders heterochromatinreichen Glyptotendipes barbipes war sie dagegen vorhanden.

In Zusammenarbeit mit E.R. Schmidt (Bochum) wurde gefunden, daß diese Fraktion zu einer beschränkten Anzahl von Kernproteinen gehört, an welche eine AT-reiche, repetitive Heterochromatin-spezifische DNA-Fraktion aus C. thummi thummi unter Konkurrenzbedingungen präferentiell und spezifisch bindet.

Nach Galaktose-Behandlung wird in den Chironomus-Larven eine spezifische Änderung der Aktivität bestimmter Genorte induziert (Beermann, 1973). Unter diesen Bedingungen wurden in den Zellkernen von C. pallidivittatus zwei neue Proteinfractionen (Molekulargewicht 180.000 D und 29.000 D) erhalten.

6. Literaturverzeichnis

- Bauer, H.: Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Speicheldrüsenchromosomen. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. 56, 239-276 (1936)
- Bauer, H.: Chromosomen und Systematik bei Chironomiden. Arch. Hydrobiol. 40, 994-1008 (1945)
- Beermann, W.: Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma (Berl.) 5, 139-198 (1952)
- Beermann, W.: Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 21, 217-232 (1956)
- Beermann, W.: Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsenmutation. Chromosoma (Berl.) 12, 1-25 (1961)
- Beermann, W.: Directed changes in the pattern of Balbiani-Ring puffing in Chironomus: Effects of sugar treatment. Chromosoma (Berl.) 41, 297-326 (1973)
- Biessmann, H., Kuger, P., Schröpfer, C., Sprindler, E.: Molecular Cloning and Preliminary Characterization of a Drosophila melanogaster Gene from a Region Adjacent to the Centromeric β -Heterochromatin. Chromosoma (Berl.) 82, 493-503 (1981)
- Billings, P.C., Orf, J.W., Palmer, D.K., Talmage, D.A., Pan, C.G., Blumenfeld, M.: Anomalous electrophoretic mobility of Drosophila phosphorylated H1 histone: Is it related to the compaction of satellite DNA into heterochromatin? Nucleic Acids Research 6, 2151-2164 (1979)

- Blumenfeld, M., Orf, J.W., Sina, B.J., Kreber, R.A., Callahan, M.A., Mullins, J.C., Snyder, L.A.: Correlation between phosphorylated H1 histones and satellite DNAs in *Drosophila virilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 866-870 (1978)
- Blumenfeld, M., Billings, P.C., Orf, J.W., Pan, C.G., Palmer, D.K., Snyder, L.A.: Differential Histone Phosphorylation During *Drosophila* Development. In: Differentiation and Neoplasia (Ed. by R.G. Mc Kinnell, M.A. Di Berardino, M. Blumenfeld, and R.D. Bergad), pp. 45-48, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1980
- Carlson, M., Brutlag, D.L.: A gene adjacent to satellite DNA in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 5898-5902 (1978)
- Chambon, P.: Summary: The molecular Biology of the Eukaryotic genome is coming of Age. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 1209-1234 (1978)
- Clever, U.: Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Chironomus tentans* und ihre Beziehungen zur Entwicklung. II. Das Verhalten der puffs während des letzten Larvenstadiums und der Puppenhäutung. Chromosoma (Berl.) 13, 385-436 (1962)
- Colman, O.D., Stockert, J.C.: Puffing patterns during Fourth larval Instar in *Chironomus pallidivittatus* Salivary glands. Chromosoma (Berl.) 53, 381-392 (1975)
- Daneholt, B.: Transcription in polytene chromosomes. Cell 4, 1-9 (1975)

- Daneholt, B., Andersson, K., Fagerlind, M.: Large-sized polysomes in *Chironomus tentans* salivary glands and their relation to Balbiani ring 75 S RNA. *J. Cell Biol.* 73, 149-160 (1977)
- Davidson, E.H., Britten, R.J.: Organization, transcription, and regulation in the animal genome. *Quart. Rev. Biol.* 48, 565-613 (1973)
- Diez, J.L., Santa-Cruz, M.C., Villanueva, A., Aller, P.: Dependence of Balbiani Ring Puffing on Protein Synthesis *Chromosoma (Berl.)* 81, 263-269 (1980)
- Edström, J.-E., Lönn, U.: Cytoplasmic zone analysis: RNA flow studied by micromanipulation. *J. Cell Biol.* 70, 562-572 (1976)
- Edström, J.-E., Lönn, U.: Cytoplasmic zone analysis in the Study of the Polysomes of Differentiated Cells. In: *Differentiation and Neoplasia* (Ed. by R.G. Mc Kimmell M.A. Di Berardino, M. Blumenfeld, and R.D. Bergad), pp. 139-146, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1980
- Elgin, S.C.R., Boyd, J.B.: The proteins of polytene chromosomes of *Drosophila hydei*. *Chromosoma (Berl.)* 51, 135-145 (1975)
- Elgin, S.C.R., Serunian, L.A., Silver, L.M.: Distribution Patterns of *Drosophila* Nonhistone Chromosomal Proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 839-850 (1978)
- Fritsch, A.: Properties of various Rotors used for zone Centrifugation. *Analyt. Biochem.* 55, 57-71 (1973)

- Gaudecker, B., von: RNA synthesis in the nucleolus of *Chironomus thummi*, as studied by high resolution autoradiography. *Z. Zellforsch.* 82, 536-557 (1967)
- Grossbach, U.: Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von *Camptochironomus*. *Chromosoma* 28, 136-187 (1969)
- Grossbach, U.: The salivary gland of *Chironomus* (Diptera). A model system for the study of cell differentiation. In: *Biochemical differentiation in insect glands* (W. Beermann, ed.), pp. 147-196, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1977
- Grossbach, U., Streichhan, I.: Transplantation of Insect Giant Chromosome Nuclei into Amphibian Oocytes. *Chromosoma* (Berl.) 82, 189-196 (1981)
- Haegeler, K.: Differential staining of polytene chromosome bands in *Chironomus* by Giemsa banding methods. *Chromosoma* (Berl.) 59, 207-216 (1977a)
- Haegeler, K.: N-Banding in Polytene Chromosomes of *Chironomus* and *Drosophila*. *Chromosoma* (Berl.) 63, 79-88 (1977b)
- Holmgren, P., Rasmuson, B., Johansson, T., Sundquist, G.: Histone Content in Relation to Amount of Heterochromatin and Developmental Stage in Three Species of *Drosophila*. *Chromosoma* (Berl.) 54, 99-116 (1976)
- Hsieh, T., Brutlag, D.L.: A protein that preferentially binds *Drosophila* satellite DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76, 726-730 (1979)

- Keyl, H.-G., Keyl, I.: Die cytologische Diagnostik der Chironomiden. I. Bestimmungstabelle für die Gattung *Chironomus* auf Grund der Speicheldrüsenchromosomen. Arch. Hydrobiol. 56, 43-57 (1959)
- Keyl, H.-G.: DNS-Konstanz im Heterochromatin von *Glyptotendipes*. Exp. Cell Res. 30, 245-247 (1963)
- Keyl, H.-G.: A demonstrable local and geometric increase in the chromosomal DNA of *Chironomus*. Experimentia (Basel) 21, 191-193 (1965a)
- Keyl, H.-G.: Duplikationen von Untereinheiten der chromosomalen DNS während der Evolution von *Chironomus thummi*. Chromosoma (Berl.) 17, 139-180 (1965b)
- Laemmli, U.K.: Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (Lond.) 227, 680-685 (1970)
- Lakhotia, S.C., Jacob, J.: EM autoradiographic studies on polytene nuclei of *Drosophila melanogaster*. II. Organization and Transcriptive Activity of the Chromosome-centre. Experimental Cell Res. 86, 253-263 (1974)
- Lamb, M.M., Daneholt, B.: Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans*. Cell 17, 835-848 (1979)
- Lezzi, M., Gilbert, L.I.: Control of gene activities in the polytene chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone and juvenile hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 64, 498-503 (1969)
- Lis, J.T., Prestidge, L., Hogness, D.S.: A novel Arrangement of Tandemly repeated Genes at a Mayor Heat Shock Site in *Dros. melanogaster*. Cell 14, 901-919 (1978)

- Mähr, R., Lezzi, M., Eppenberger, H.M.: Mess isolation of polytene nuclei from *Chironomus* salivary glands. *J. Cell Sci.* 27, 1-12 (1977)
- Maizel, J.V.: Fundamental Techniques of Virology (edit. by Habel, K., and Salzman, N.P.), chap. 32, 334 (Academic Press, New York, 1969)
- Molloy, J., Rickwood, D.: Characteristics of Ultracentrifuge Rotors and Tubes. In: Centrifugal Separations in Molecular and Cell Biology (ed. by G.D. Birnie, D. Rickwood) pp. 289-313, Butterworths, London-Boston (1978)
- Müller, G.H.: Sequenz und Konsequenz molekularer Vorgänge während der Ionen-induzierten Genaktivierung. Untersuchungen an *Chironomus thummi* Polytänchromosomen. Dissertation, Saarbrücken (1979)
- Musich, P.R., Brown, F.L., Maio, J.J.: Subunit structure of chromatin and the organization of eukaryotic highly repetitive DNA. Nucleosomal proteins associated with a highly repetitive mammalian DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74, 3297-3301 (1977)
- Musich, P.R., Brown, F.L., Maio, J.J.: Mammalian repetitive DNA and the subunit structure of chromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 1147-1160 (1978)
- Palmer, D., Snyder, L.A., Blumenfeld, M.: *Drosophila* nucleosomes contain an unusual histone-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77, 2671-2675 (1980)
- Pankow, W., Lezzi, M., Holderegger-Mähling, I.: Correlated changes of Balbiani ring expansion and secretory protein synthesis in larval salivary glands of *Chironomus tentans*. *Chromosoma (Berl.)* 58, 137-153 (1976)

- Pelling, C.: Ribonukleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans. Chromosoma (Berl.) 15, 71-122 (1964)
- Plagens, U.: Effect of salt-treatment on manually isolated polytene chromosomes from Chironomus tentans. Chromosoma (Berl.) 68, 1-19 (1978)
- Ristow, H., Arends, S.: A system in vitro for the synthesis of RNA and proteins by isolated salivary glands and by nuclei from Chironomus larvae. Biochim. biophys. Acta 157, 178-186 (1968)
- Ritossa, F.M.: A new Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila. Experientia (Basel) 18, 571-575 (1962)
- Ritossa, F.M.: Experimental Activation of specific loci in polytene Chromosomes of Drosophila. Exp. Cell Research 35, 601-607 (1964)
- Robert, M.: Isolation and manipulation of salivary gland nuclei and chromosomes. Methods Cell Biol. 9: 377-390 (1975)
- Rodriguez Alfageme, C., Zweidler, A., Mahowald, A., Cohen, L.H.: Histones of Drosophila embryos: Isolation and structural studies. J. biol. Chem. 249, 3729-3736 (1974)
- Rodriguez Alfageme, C., Rudkin, G.T., Cohen, L.H.: Locations of chromosomal proteins in polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2038 (1976)
- Rodriguez Alfageme, C., Rudkin, G.T., Cohen, L.H.: Isolation, Properties and Cellular Distribution of D₁, a Chromosomal Protein of Drosophila. Chromosoma (Berl.) 78, 1-31 (1980)

- Santa-Cruz, M.C., Villanueva, A., Diez, J.L.: Effect of Galactose Treatment in the puffing Pattern of *Chironomus thummi* Balbiani rings. *Chromosoma (Berl.)* 69, 93-100 (1978)
- Saumweber, H., Symmons, P., Kabisch, R., Will, H., Bonhoeffer, F.: Monoclonal Antibodies against Chromosomal Proteins of *Drosophila melanogaster*. Establishment of Antibody Producing Cell Lines and Partial Characterization of Corresponding Antigens. *Chromosoma (Berl.)* 80, 253-275 (1980)
- Serfling, E., Huth, A.: Balbiani Ring RNA in the Cytoplasm of *Chironomus thummi* Salivary Gland Cells. *Chromosoma (Berl.)* 66, 205-223 (1978)
- Silver, L.M., Elgin, S.C.R.: Distribution patterns of three subfractions of *Drosophila* nonhistone chromosomal proteins: Possible correlations with gene activity. *Cell* 11: 971 (1977)
- Spradling, A., Penman, S., Pardue, M.L.: Analysis of *Drosophila* mRNA by in situ Hybridization: Sequences Transcribed in Normal and Heat Shocked Cultured Cells. *Cell* 4, 395-404 (1975)
- Spradling, A., Pardue, M.L., Penman, S.: Messenger RNA in Heat-shocked *Drosophila* Cells. *J. Mol. Biol.* 109, 559-587 (1977)
- Schmidt, E.R., Vistorin, G., Keyl, H.-G.: An AT-rich DNA component in the genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma (Berl.)* 76, 35-45 (1980a)

- Schmidt, E.R.: Two AT-rich Satellite DNAs in the Chironomid *Glyptotendipes barbipes* (Staeger). Isolation and localization in Polytene Chromosomes of *G. barbipes* and *Chironomus thummi*. *Chromosoma* (Berl.) 79, 315-328 (1980b)
- Schmidt, E.R.: The development of a 120 Basepair repetitive DNA Sequence in *Chironomus thummi* is correlated to the duplication of defined chromosomal segments. *Febs Letters* 129, 21-24 (1981)
- Schmidt, E.R., Keyl, H.-G.: In situ Binding of AT-rich repetitive DNA to the centromeric Heterochromatin in Polytene Chromosomes of Chironomids. *Chromosoma* (Berl.) 82, 197-204 (1981)
- Steinemann, M.: Co-replication of satellite DNA of *Chironomus melanos* with mainband DNA during polytenization. *Chromosoma* (Berl.) 66, 127-139 (1978)
- Stockert, J.C., Diez, J.L.: The formation of ribonucleoprotein droplets in *Chironomus* salivary gland nuclei. *Chromosoma* (Berl.) 74, 83-103 (1979)
- Tanguay, R.M., Nicole, L.M.: Proteins of Microdissected Polytenic Cells. I. Nuclear and Cytoplasmic Proteins from *Chironomus tentans* salivary glands. *Chromosoma* (Berl.) 76, 219-235 (1980)
- Tanguay, R.M., Vincent, M.: Biosynthesis and characterization of heat shock proteins in *Chironomus tentans* salivary glands. *Canad. J. of Biochem.* 59, 67-73 (1981)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, 4350-4354 (1979)

- Vincent, M., Tanguay, R.M.: Heat-shock induced proteins present in the cell nucleus of *Chironomus tentans* salivary gland. *Nature (Lond.)* 281, 501-503 (1979)
- Walter, L.: Syntheseprozesse an den Riesenchromosomen von *Glyptotendipes*. *Chromosoma (Berl.)* 41, 327-360 (1973)
- Weber, K., Kufer, D.J.: Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 246, 4504 (1971)
- Westermann, R.: Vergleichende Untersuchung über die Kernprotein-Zusammensetzung in Kalbsthymus und den Speicheldrüsen von *Chironomus thummi*. Diplomarbeit, Göttingen, 1981
- Will, H., Bautz, E.K.F.: Immunological identification of a chromocenter associated protein in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 125, 401-410 (1980)
- Wobus, U.: Molecular characterization of an insect genome: *Chironomus thummi*. *Europ. J. Biochem.* 59, 287-293 (1975)
- Yamamoto, H.: Heat shock induced puffing changes in Balbiani rings. *Chromosoma (Berl.)* 32, 171-190 (1970)

Lebenslauf

Am 3. Oktober 1952 wurde ich, Josef Bendermacher-Geroussis, in Athen/Griechenland geboren. Meine Eltern sind Emil und Anna Bendermacher-Geroussis. Seit August 1977 bin ich mit Eugenia Bendermacher-Geroussis geb. Michalopoulou verheiratet. Am 5. März 1980 wurde unser Sohn Emil geboren.

Von 1958 besuchte ich die Grundschule in Athen, ab 1964 das II. Staatliche Gymnasium Athen, und von 1968 bis 1970 das Barbakaios Gymnasium, Athen, wo ich im Juli 1970 die Reifeprüfung bestand.

Nach bestandener Aufnahmeprüfung studierte ich von 1970 bis 1974 an der Universität Athen Biologie. Am 11. Januar 1975 schloß ich mein Studium mit der Abschlußprüfung ab. Diese wurde am 7. Februar 1975 vom Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus als der Diplomprüfung für Biologie in Deutschland gleichwertig anerkannt.

Im März 1975 wechselte ich in die Arbeitsgruppe von Herrn Privatdozent Dr. Ulrich Grossbach in München über und begann dort mit meiner Dissertation. Bis März 1977 war ich gleichzeitig als wissenschaftliche Hilfskraft beschäftigt. Ich verließ München im April 1977, als die Arbeitsgruppe von Herrn Grossbach an die Universität Göttingen übersiedelte. Seit April 1977 bin ich an der Universität Göttingen weiter mit dem Anfertigen der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

Zwischenzeitlich leistete ich vom 1. Oktober 1976 bis 31. Dezember 1976 meinen Grundwehrdienst in Griechenland ab.

Göttingen, im September 1981

